

**POLİ(POLİOL)SEBAKAT BAZLI  
BİYOBÖZÜNÜR ELASTOMERLERİN SENTEZİ VE  
JİRO EĞRİLMİŞ FİBER DESTEKLİ HİDROJEL DOKU  
İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**SYNTHESIS OF POLY(POLYOL)SEBACATE BASED  
BIODEGRADABLE ELASTOMERS AND DEVELOPMENT  
OF GYRO FIBER INTEGRATED HYDROGEL  
SCAFFOLDS**

**MERVE GÜLTEKİNOĞLU BAYRAM**

**PROF. DR. KEZBAN ULUBAYRAM**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı için Öngördüğü

**DOKTORA TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

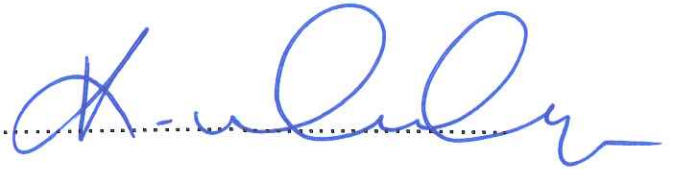
2019

**MERVE GÜLTEKİNOĞLU BAYRAMI**'in hazırladığı “Poli(Poliol)Sebakat Bazlı Biyobozunur Elastomerlerin Sentezi ve Jiro Eğrilmiş Fiber Destekli Hidrojel Doku İskelelerinin Geliştirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Başkan



Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM  
Danışman



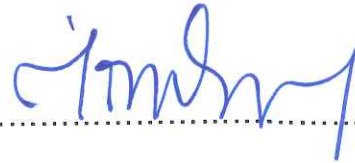
Prof. Dr. Mustafa TÜRK  
Üye



Doç. Dr. Eda Ayşe AKSOY  
Üye



Doç. Dr. İrem EREL GÖKTEPE  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak ...../...../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Cem'e*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

29 / 01 / 2019



MERVE GÜLTEKİNOĞLU BAYRAM

## YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI


Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .... ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

29 / 01 / 2019

 (İmza)

MERVE GÜLTEKİNOĞLU BAYRAM

## ÖZET

# **POLİ(POLİOL)SEBAKAT BAZLI BİYOBOZUNUR ELASTOMERLERİN SENTEZİ VE JİRO EĞRİLMİŞ FİBER DESTEKLİ HİDROJEL DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Merve GÜLTEKİNOĞLU BAYRAM**

**Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM**

**Ocak 2019, 151 sayfa**

Poli(poliol) sebakat (PPS) bazlı polimerler değiştirilebilir mekanik özellikleri, biyobozunur ve biyouyumlu olmaları nedeniyle biyomedikal ve doku mühendisliği uygulamalarında umut vaat eden polimerlerdir. Ancak sentez koşullarının zorluğu, sentez süresinin uzun olması ve üretim koşullarındaki zorluklar PPS elastomerlerin yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. Bu tez çalışmasında PPS bazlı polimerlerin sentezindeki zorlukların mikrodalga polimerizasyonu ile aşılması, PPS elastomerlerine poli(etilen glikol) (PEG) katılarak fiber üretim koşullarının iyileştirilmesi ve doku iskelesi olarak kullanımı hedeflenmiştir.

Bu amaçla tez çalışmasının ilk bölümünde poli(gliserol) sebakat (PGS), poli(ksilitol) sebakat (PXS), poli(gliserol)sebakat-ko-poli(etilen glikol) (PGS-ko-PEG) ve poli(ksilitol)sebakat-ko-poli(etilen glikol) (PXS-ko-PEG) polimerleri mikrodalga polimerizasyonu ile yaklaşık 4 dakikada sentezlenmiştir. Termal

çapraz bağlanma reaksiyonları düşük basınç ve yüksek sıcaklıkta gerçekleşmiştir. Ksilitol içeren PXS ve PXS-ko-PEG polimerlerinde serbest hidroksil gruplarına bağlı olarak çapraz bağlanma süresinin uzadığı tespit edilmiştir. PEG'in poli(poliol) sebakat polimerlerine katılması ile elastik modülüs değerleri  $1.20 \pm 0.01$  MPa'dan,  $0.060 \pm 0.004$  MPa'a azalırken, kopma noktasındaki % uzamanın ~%99'dan ~%160'a arttığı görülmüştür. Polimerlerin termal özellikleri incelendiğinde camsı geçiş sıcaklıklarının  $-28.53$  ve  $-35.48$  °C aralığında olduğu ve vücut sıcaklığında elastik davranış sergilediği görülmüştür. Aynı zamanda % kütle kaybının 21 günde % 4.4'den 9.3'e arttığı gözlenmiştir. PEG'in polimer yapısında su tutma kapasitesini arttırarak hidrolitik bozunma hızını artırdığı sonucuna varılmıştır. Sentezlenen polimerlerin L929 fibroblast hücrelerinde toksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

Tezin ikinci bölümünde sentezlenen PPS polimerlerinden elektrohidrodinamik (EHD) taşınabilir tabanca ve basınçlı jirasyon teknikleri kullanılarak fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. EHD sistemi ile jirasyon tekniğine göre daha düşük çaplı (~ 1 µm) fiberler elde edilirken, polimer çözeltisinin iletkenliği ve yüzey gerilimine bağlı olarak uygulanan elektrik alan artış göstermiştir. Yapıya PEG'in katılması ile PXS-ko-PEG ve PGS-ko-PEG polimer çözeltilerinin iletkenlik değerlerinde yaklaşık 3.5 kat artış gözlenmiştir. İletkenlik değerlerindeki bu artış, şırınga jet oluşumundaki mesafeyi kısaltırken, toplayıcıdaki fiber alanının artmasına neden olmuştur. EHD ile üretilen PPS fiberlerin hücre tutunması ve proliferasyonunu desteklediği belirlenmiştir. Özellikle PXS-ko-PEG fiberlerin 7 gün sonra hücre canlılığı diğerlerine göre anlamlı derecede artış göstermiştir.

Basınçlı jirasyon tekniği ile üretilen fiber çapları (~ 10 µm) EHD sistemi ile üretilen fiberlere kıyasla artış göstermektedir. Jiro-eğrilmiş fiber üretiminde dönüş hızı, basınç, çözelti konsantrasyonu ve viskozitesinin fiber oluşumunu doğrudan etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca jiro-eğrilmiş fiberlerin artan çaplarının, yığın yapıda oluşan poroziteyi arttırdığı ve hücrelerin üç boyutlu yapı içerisinde yayılarak çoğalmasına imkân vermiş olduğu belirlenmiştir. Üç-boyutlu jiro-eğrilmiş fiber yüzeyine fibroblast hücrelerin tutunduğu ve yayıldığı mikroskopik incelemelerle belirlenmiştir.

Tezin son bölümünde jelatin metakrilat (Gel-M) hidrojelini sentezlenerek, farklı derişimlerde hazırlanan hidrojelinin su tutma kapasitesi, degradasyon ve viskoelastik özellikleri belirlenmiştir. Elastomerik PPS fiber yapıları, sentezlenen jelatin metakrilat (Gel-M) jeline entegre edilerek, UV kürlleme ile hibrid doku iskeleleri elde edilmiştir. Fiberlerle güçlendirilmiş hibrid doku iskelelerinin fibroblast ve keratinosit hücrelerin ko-kültürlerini desteklediği, hücre canlılıklarını ve proliferasyonunu artırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak geliştirilen hibrid doku iskelelerinin dermal doku mühendisliğinde kullanım potansiyellerinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Poli(Poliol)Sebakat, Elastomer, Mikrodalga Polimerizasyonu, Fiber, Basınçlı Jirasyon, Hidrojel, Doku İskelesi.



## **ABSTRACT**

# **SYNTHESIS OF POLY(POLYOL)SEBACATE BASED BIODEGRADABLE ELASTOMERS AND DEVELOPMENT OF GYRO FIBER INTEGRATED HYDROGEL SCAFFOLDS**

**Merve GÜLTEKİNOĞLU BAYRAM**

**Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM**

**January 2019, 151 pages**

Poly(polyol) sebacate (PPS) based polymers are promising polymers in biomedical and tissue engineering field, thanks to tunable mechanical properties and having biodegradable and biocompatible features. However, difficult conditions and long duration in synthesis and also challenges in processability limit the widespread use of PPS elastomers. In this thesis study, it is aimed to overcome the difficulties in the synthesis of PPS based polymers by microwave polymerization, to improve fiber production by adding poly(ethylene glycol) (PEG) and to use them as tissue scaffolds.

By this regard, in the first part of thesis study poly(glycerol)sebacate (PGS), poly(xylitol)sebacate (PXS), poly(glycerol)sebacate-co-poly(ethylene glycol) (PGS-co-PEG) and poly(xylitol)sebacate-co-poly(ethylene glycol) (PXS-co-PEG) polymers were synthesized approximately in 4 minutes by microwave polymerization. Crosslinking time have been found to prolong in xylitol containing

PXS and PXS-co-PEG polymers due to free hydroxyl groups. PEG addition to poly(polyol) sebacate polymers, the elastic modulus values decreased from  $1.20 \pm 0.01$  MPa to  $0.060 \pm 0.004$  MPa, while the % extension at break point increased from ~ 99% to ~ 160%. When the thermal properties of the polymers were examined, it was found that the glass transition temperatures were between -28.53 and -35.48 °C and they exhibited elastic behavior at body temperature. At the same time, % mass loss increased from 4.4% to 9.3% in 21 days in the presence of PEG. It is concluded that PEG increases the amount of water uptake and the rate of hydrolytic degradation in the polymer structure. It was determined that the synthesized polymers had no toxic effect on L929 fibroblast cells.

In the second part of the thesis, PPS polymers were synthesized using electrohydrodynamic (EHD) portable gun and pressurized gyration techniques. Lower diameter (~ 1  $\mu\text{m}$ ) fibers were obtained with the EHD system, compared to the gyration technique and applied electrical field increased depending on the conductivity of polymer solution and surface tension. The conductivity of PGS-co-PEG and PXS-co-PEG polymer solutions was found to be increased by 3.5 times higher after PEG addition. This increase in conductivity values caused the fiber area in the collector to increase while shortening the distance in the syringe jet formation. It was determined that PPS fibers produced by EHD support cell attachment and proliferation. Especially after 7 days of PXS-co-PEG fibers, cell viability was significantly increased compared to other sample groups.

The fiber diameters produced by the pressurized gyration technique increased (~ 10  $\mu\text{m}$ ) compared to the fibers produced by the EHD system. It has been determined that rotation speed, pressure, solution concentration and viscosity directly affects the gyrospon fiber formation. In addition, the increased diameters of the gyrospon fibers increased the porosity of the resulting bulk structure and allowed the cells to propagate in the three-dimensional structure and were advantageous compared to the fibers produced with EHD. Fibroblast cell attachment and spreading on three-dimensional gyrospon fiber was determined by microscopic investigations.

In the last part of the thesis, gelatin methacrylate (Gel-M) hydrogel was synthesized and the swelling, degradation and viscoelastic properties were determined for hydrogels with different concentration parameters. Elastomeric PPS fiber constructs were integrated into synthesized gelatin methacrylate (Gel-M) gel and hybrid scaffolds were obtained by UV curing. Fibers reinforced hybrid tissue scaffolds support the co-cultures of fibroblast and keratinocyte cells and increase the cell viability and proliferation. As a result, it has been concluded that the hybrid tissue scaffolds have a high potential for skin tissue engineering.

**Keywords:** Poly(Polyol)Sebacate, Elastomer, Microwave Polymerization, Fiber, Pressurized Gyration, Hydrogel, Scaffolds.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilgisini, tecrübesini, imkanlarını ve sevgisini paylaşmaktan çekinmeyen, akademik ve sosyal yaşantımdaki gelişmelerde attığı her imzayla ayrı mutluluk duyduğum, danışman hocam Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a,

Tez çalışmalarına TDK-2017-14725 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tez çalışmalarım sırasında bana laboratuvarında çalışma imkanı sağlayan, bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Mohan Edirisinghe'ye,

Doktora tez dönemim boyunca değerli katkılarından dolayı doktora tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Mustafa Türk ve Doç. Dr. Eda Ayşe Aksoy'a,

Değerli yardımları ve arkadaşlıklarından dolayı Xinyue Jiang, Maryam Crabbe-mann ve Keith Lau'ya,

Hücre kültürü çalışmalarındaki yardımları ve arkadaşlığı için Şükrü Öztürk'e,

Değerli arkadaşlığı ve desteği için Halime Serinçay'a,

Sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim canım aileme ve

Desteği ve sevgisiyle yolumu aydınlatan hayat arkadaşım Cem Bayram'a

Sonsuz teşekkürler...

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Elastomerler .....	4
2.1.1. Poliüretanlar .....	6
2.1.2. Polihidroksialkanoatlar .....	7
2.1.3. Silikon Elastomerler .....	8
2.1.4. Poli(poliol)Sebakatlar .....	9
2.2. Hidrojeller .....	13
2.2.1. Doğal Kaynaklı Hidrojeller.....	14
2.2.2. Sentetik Kaynaklı Hidrojeller .....	15
2.2.3. Yarısentetik Hidrojeller .....	15
2.2.4. Jelleşme Türlerine Göre Hidrojeller.....	19
2.2.2.1. Fiziksel Çapraz Bağlanan Hidrojeller.....	19
2.2.2.2. Kimyasal Çapraz Bağlanan Hidrojeller .....	19
2.3. Doku İskelesi Üretim Teknikleri .....	20
2.3.1. Elektrohüdrodinamik Eğirme .....	22
2.3.2. Islak Eğirme .....	23
2.3.3. Dönel Eğirme Teknikleri.....	24
2.3.3.1. Basınçlı Jirasyon .....	24
2.3.3.2. Eriyik Jirasyon .....	28

2.3.3.3. Beslemeli Jirasyon .....	28
2.4. Deri Doku Mühendisliği Yaklaşımları.....	29
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	33
3.1. Materyal .....	33
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar .....	33
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Poli(poliol) Sebakat Polimerlerinin Sentezi .....	35
3.2.1.1. Poli(gliserol) Sebakat (PGS) Polimerinin Sentezi.....	35
3.2.1.2. Poli(ksilitol)Sebakat (PXS) Polimerinin Sentezi.....	36
3.2.2. Poli(poliol sebakat)-ko-poli(etilen glikol) (PPS-ko-PEG) Polimerinin Sentezi .....	36
3.2.2.1. Poli(gliserol sebakat)-ko-poli(etilen glikol) (PGS-ko- PEG).....	37
3.2.2.2. Poli(ksilitol sebakat)-ko-poli(etilen glikol) (PXS-ko- PEG).....	37
3.3. Fiber Üretimi .....	40
3.3.1. Taşınabilir Elektro Hidrodinamik Sistem ile Poli(poliol) Sebakat Elektro-Eğrilmiş Fiber Üretimi .....	40
3.3.2. Basıncılı Jirasyon Tekniği ile Poli(poliol) Sebakat Jiro-Eğrilmiş Fiber Üretimi .....	40
3.4. Gelatin Metakrilat (Gel-M) Sentezi .....	41
3.5. Sentezlenen Polimer Yapıların Karakterizasyonu .....	42
3.5.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	42
3.5.2. <sup>1</sup> H-NMR Analizi.....	42
3.5.3. Termal Gravimetrik Analiz (TGA) .....	42
3.5.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi .....	42
3.5.5. Mekanik Test .....	43
3.5.6. Çözeltilerin Viskozite ve Yüzey Gerilimi Değerlerinin Belirlenmesi .....	43
3.5.7. Hidrojellerin Su Tutma Kapasitelerinin Belirlenmesi .....	43
3.5.8. Hidrolitik Bozunma Profillerinin Belirlenmesi .....	44
3.5.9. Hidrojel Yapıların Viskoelastik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	44

3.5.10. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu .....	44
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	45
3.6.1. İndirekt Sitotoksite Çalışmaları .....	45
3.6.2. Direkt Hücre Canlılığı Çalışmaları .....	46
3.6.3. Canlı/Ölü Hücre Kültürü Çalışmaları .....	47
3.6.4. Ko-kültür Hücre Çalışmaları .....	48
3.7. İstatiksel Analiz .....	50
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	51
4.1. Poli(poliol) Sebakat (PPS) Bazlı Polimerlerin Yapı-Özellik İlişkileri ....	52
4.1.1. Poli(glisero) Sebakat (PGS) Polimeri .....	53
4.1.2. Poli(ksilitol) Sebakat (PXS) Polimeri .....	56
4.1.3. Poli(glisero)Sebakat-ko-Poli(etilen glikol) Kopolimeri .....	61
4.1.4. Poli(ksilitol) Sebakat-ko-Poli(etilen) Glikol Kopolimeri .....	69
4.1.5. Poli(poliol) Sebakat ve Türevlerinin Hidrolitik Bozunma Davranışları .....	80
4.1.6. Poli(poliol) Sebakat ve Türevlerinin Hücre Canlılığına Etkisi ...	81
4.2. Gelatin Metakrilat Hidrojellerin Özellikleri .....	82
4.3. Poli(poliol)Sebakat Bazlı Fiberlerin Özellikleri .....	91
4.3.1. Taşınabilir Elektro Hidrodinamik Sistem ile Elektro-Eğrilmiş Fiberler .....	92
4.3.2. Basıncılı Jirasyon Tekniği ile Poli(poliol) Sebakat Jiro-Eğrilmiş Fiberler .....	102
4.4. EHD ve Jiro Eğrilmiş Fiberlerin Hücre Etkileşimleri .....	110
4.5. Gel-M Hidrojellerde Hücre Canlılığı .....	117
4.6. Jiro Eğrilmiş Fiber Destekli Hibrid Hidrojel Doku İskelelerinde Ko-Kültür Çalışmaları .....	118
5. YORUM .....	125
6. KAYNAKLAR .....	127
ÖZGEÇMİŞ .....	150

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Üretan grubu. ....	6
Şekil 2.2.	Polihidroksialkanoatlar. ....	8
Şekil 2.3.	PGS polimer yapısı. ....	11
Şekil 2.4.	Jelatinin metakrilik anhidrit varlığında metakrilatlanma reaksiyonu (hücre tutunmasında rol oynayan RGD sekansı). ....	18
Şekil 2.5.	A) Elektroçirime düzeneğinin şematik gösterimi, B) Taşınabilir EHD düzeneğinin görüntüsü, C) Taşınabilir tabanca. ....	22
Şekil 2.6.	Basınçlı jirasyon tekniğinin şematik gösterimi. ....	25
Şekil 2.7.	Basınçlı jirasyon tekniğinde merkezkaç kuvvetinin polimer jeti üzerindeki etkisi. ....	26
Şekil 3.1.	Poli(gliserol) sebakat (PGS) sentezi. ....	35
Şekil 3.2.	Poli(ksilitol) sebakat (PXS) sentezi. ....	36
Şekil 3.3.	PPS-ko-PEG ön polimerlerinin sentezi. 1) Sebasik asit – polietilen glikol ön polimer sentezi, 2) PGS-ko-PEG ve 3) PXS-ko-PEG ön polimerlerinin sentezi. ....	38
Şekil 3.4.	Jiro-eğrilmiş fiber üretimin basamaklarının şematik gösterimi. Jiro-eğrilmiş fiberlerin 1) üretimi, 2) toplanması, 3) çapraz bağlanması. ....	41
Şekil 3.5.	Jiro-eğrilmiş fiber destekli hidrojel doku iskelelerinde fibroblast-keratinosit ko-kültürlerinin şematik gösterimi. ....	48
Şekil 4.1.	PGS ön ve PGS polimerlerin FT-IR spektrumları. ....	53
Şekil 4.2.	PGS ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	54
Şekil 4.3.	PGS ve PGS ön polimerlerinin TGA termogramları. ....	55
Şekil 4.4.	PGS polimerinin DSC termogramları. ....	56
Şekil 4.5.	PXS ön ve PXS polimerlerinin FT-IR spektrumları. ....	57
Şekil 4.6.	PXS ön polimerinin genel <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	57
Şekil 4.7.	PXS ön ve PXS polimerlerinin TGA termogramları. ....	58
Şekil 4.8.	PXS polimerinin DSC termogramları. ....	59
Şekil 4.9.	PGS ve PXS polimerlerinin gerilim-gerinim eğrileri. ....	61



Şekil 4.10. PGS-PEG <sub>1</sub> , PGS-PEG <sub>2</sub> ve PGS-PEG <sub>3</sub> ön polimerlerinin FT-IR spektrumları.....	62
Şekil 4.11. PGS-PEG <sub>1</sub> , PGS-PEG <sub>4</sub> , PGS-PEG <sub>5</sub> , PGS-PEG <sub>6</sub> ve PGS-PEG <sub>7</sub> ön polimerlerinin FT-IR spektrumları. ....	64
Şekil 4.12. PGS-PEG <sub>1</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	65
Şekil 4.13. PGS-PEG <sub>2</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	65
Şekil 4.14. PGS-PEG <sub>3</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	65
Şekil 4.15. PGS-PEG <sub>4</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	66
Şekil 4.16. PGS-PEG <sub>5</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	66
Şekil 4.17. PGS-PEG <sub>6</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	66
Şekil 4.18. PGS-PEG <sub>7</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	67
Şekil 4.19. PGS, PGS-PEG <sub>1</sub> , PGS-PEG <sub>4</sub> , PGS-PEG <sub>5</sub> , PGS-PEG <sub>6</sub> ve PGS-PEG <sub>7</sub> ön polimerlerinin TGA termogramları.....	68
Şekil 4.20. PGS, PGS-PEG <sub>1</sub> , PGS-PEG <sub>4</sub> , PGS-PEG <sub>5</sub> , PGS-PEG <sub>6</sub> ve PGS-PEG <sub>7</sub> polimerlerinin TGA termogramları.....	68
Şekil 4.21. PXS-PEG <sub>1</sub> , PXS-PEG <sub>2</sub> ve PXS-PEG <sub>3</sub> ön polimerlerinin FT-IR spektrumları.....	69
Şekil 4.22. PXS-PEG <sub>1</sub> , PXS-PEG <sub>4</sub> , PXS-PEG <sub>5</sub> , PXS-PEG <sub>6</sub> ve PXS-PEG <sub>7</sub> ön polimerlerinin FT-IR spektrumları. ....	70
Şekil 4.23. PXS-PEG <sub>1</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	72
Şekil 4.24. PXS-PEG <sub>2</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	72
Şekil 4.25. PXS-PEG <sub>3</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	73
Şekil 4.26. PXS-PEG <sub>4</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	73
Şekil 4.27. PXS-PEG <sub>5</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	73
Şekil 4.28. PXS-PEG <sub>6</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	74
Şekil 4.29. PXS-PEG <sub>7</sub> ön polimerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	74
Şekil 4.30. PXS, PXS-PEG <sub>1</sub> , PXS-PEG <sub>4</sub> , PXS-PEG <sub>5</sub> , PXS-PEG <sub>6</sub> ve PXS-PEG <sub>7</sub> ön polimerlerinin TGA termogramları.....	75
Şekil 4.31. PXS, PXS-PEG <sub>1</sub> , PXS-PEG <sub>4</sub> , PXS-PEG <sub>5</sub> , PXS-PEG <sub>6</sub> ve PXS-PEG <sub>7</sub> polimerlerinin TGA termogramları.....	76
Şekil 4.32. PGS-ko-PEG polimerinin DSC termogramları. ....	78
Şekil 4.33. PXS-ko-PEG polimerinin DSC termogramları.....	79

Şekil 4.34. PGS- <i>ko</i> -PEG ve PXS- <i>ko</i> -PEG polimerlerinin gerilim-gerinim eğrileri. ....	80
Şekil 4.35. PGS, PXS, PGS- <i>ko</i> -PEG ve PXS- <i>ko</i> -PEG hidrolitik bozunma grafikleri. ....	81
Şekil 4.36. PGS, PXS, PGS- <i>ko</i> -PEG ve PXS- <i>ko</i> -PEG polimerlerinin L929 fibroblast hücre hattı ile gerçekleştirilen MTT test sonuçları.....	82
Şekil 4.37. Gel-M sentez reaksiyon şeması. ....	83
Şekil 4.38. Gel-M <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. ....	83
Şekil 4.39. Gel-M hidrojellerin su tutma kapasitesi. ....	84
Şekil 4.40. Gel-M hidrojellerin hidrolitik bozunma profilleri.....	85
Şekil 4.41. % 10'luk Gel-M hidrojelin frekans taraması.....	86
Şekil 4.42. % 7.5'luk Gel-M hidrojelin frekans taraması.....	86
Şekil 4.43. % 5'lik Gel-M hidrojelin frekans taraması. ....	87
Şekil 4.44. % 10'luk Gel-M hidrojelin % gerinim taraması.....	88
Şekil 4.45. % 7.5'luk Gel-M hidrojelin % gerinim taraması.....	88
Şekil 4.46. % 5'lik Gel-M hidrojelin % gerinim taraması. ....	89
Şekil 4.47. Gel-M hidrojellerin % gerinim taraması verilerinin karşılaştırılması. ...	89
Şekil 4.48. Gel-M hidrojellerin keratinosit hücreler ile gerçekleştirilen <i>in vitro</i> indirekt MTT test sonuçları. *anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0.05). ....	90
Şekil 4.49. Taşınabilir EHD tabanca sistemi ile elektro-eğrilmiş fiberlerin üretiminin şematik gösterimi. A) taşınabilir EHD tabanca, B) fiber jet oluşumu, C) ısıtma, D) PPS fiberlerin eldesi, E) hücre-malzeme etkileşimi.....	93
Şekil 4.50. Fiber jet görüntüleri A) PGS, B) PXS, C) PGS- <i>ko</i> -PEG ve D) PXS- <i>ko</i> -PEG (24 µL/dk akış hızında). ....	94
Şekil 4.51. PGS:PVA fiberlerin SEM görüntüleri. A) 24 µL/dk akış hızı (ölçek:25 µm), B) 24 µL/dk akış hızı (ölçek:5 µm), C) 48 µL/dk akış hızı (ölçek:25 µm) ve D) 48 µL/dk akış hızı (ölçek:5 µm). ....	95
Şekil 4.52. PXS:PVA fiberlerin SEM görüntüleri. A) 24 µL/dk akış hızı (ölçek:25 µm), B) 24 µL/dk akış hızı (ölçek:5 µm), C) 48 µL/dk akış hızı (ölçek:25 µm) ve D) 48 µL/dk akış hızı (ölçek:5 µm). ....	96

- Şekil 4.53. PGS-*ko*-PEG:PVA fiberlerin SEM görüntüleri. A) 24 µL/dk akış hızı (ölçek:25 µm), B) 24 µL/dk akış hızı (ölçek:5 µm), C) 48 µL/dk akış hızı (ölçek:25 µm) ve D) 48 µL/dk akış hızı (ölçek:5 µm)..... 97
- Şekil 4.54. PXS-*ko*-PEG:PVA fiberlerin SEM görüntüleri. A) 24 µL/dk akış hızı (ölçek:25 µm), B) 24 µL/dk akış hızı (ölçek:5 µm), C) 48 µL/dk akış hızı (ölçek:25 µm) ve D) 48 µL/dk akış hızı (ölçek:5 µm)..... 98
- Şekil 4.55. Çapraz bağlanmış ve yıkanmış fiberlerin morfolojileri. A) PGS, B) PXS, C) PGS-*ko*-PEG ve D) PXS-*ko*-PEG (24 µL/dk akış hızında, ölçek:5 µm)..... 99
- Şekil 4.56. Fiberlerin çapraz bağlanma ve yıkama işlemleri sonundaki FT-IR spektrumları. A)PGS, B)PGS-*ko*-PEG, C)PXS ve D)PXS-*ko*-PEG (24 µL/dak akış hızında). ..... 100
- Şekil 4.57. PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimerlerinin direkt MTT test sonuçları. \*,\*\* ve \*\*\* anlamlı farkları ifade etmektedir (p<0.05). ..... 101
- Şekil 4.58. % 5'lik PGS:PVA çözeltisi ile üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. A) orta molekül ağırlıklı PVA, B) yüksek molekül ağırlıklı PVA..... 103
- Şekil 4.59. % 10'luk PGS:PVA çözeltisi ile üretilen jiro-fiberlerin SEM görüntüleri (PVA:düşük molekül ağırlıklı). A) 250x büyütme, B) 500x büyütme..... 105
- Şekil 4.60. PGS:PVA jiro-fiberlerin A) basınçlı jirasyon, B) termal çapraz bağlama ve C) yıkama işlemleri sonrası SEM görüntüleri. .... 106
- Şekil 4.61. PXS:PVA jiro-fiberlerin A) basınçlı jirasyon, B) termal çapraz bağlama ve C) yıkama işlemleri sonrası SEM görüntüleri. .... 107
- Şekil 4.62. PGS-*ko*-PEG:PVA jiro-fiberlerin A) basınçlı jirasyon, B) termal çapraz bağlama ve C) yıkama işlemleri sonrası fiber morfolojilerinin SEM görüntüleri..... 107
- Şekil 4.63. PXS-*ko*-PEG:PVA jiro-fiberlerin A) basınçlı jirasyon, B) termal çapraz bağlama ve C) yıkama işlemleri sonrası morfolojilerinin SEM görüntüleri..... 108

- Şekil 4.64. Jiro-eğrilmiş fiberlerin çapraz bağlanma ve yıkama işlemleri sonrası FT-IR spektrumları A) PGS, B) PXS, C) PGS-ko-PEG ve D) PXS-ko-PEG. .... 109
- Şekil 4.65. Fibroblast hücrelerin EHD tabanca ile üretilen fiberlerle kültürünün 7. gün canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) TCP-kontrol, B) PGS, C) PXS, C) PGS-ko-PEG ve D) PXS-ko-PEG.. 111
- Şekil 4.66. Fibroblast hücrelerin EHD tabanca ile üretilen fiberlerle 7. gün SEM görüntüleri. A) PGS, B) PXS, C) PGS-ko-PEG ve D) PXS-ko-PEG. .... 112
- Şekil 4.67. Fibroblast hücrelerin jiro-fiberler ile kültürünün 1. gün canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) TCP, B) PGS, C) PXS, D) PGS-ko-PEG ve E) PXS-ko-PEG..... 114
- Şekil 4.68. Fibroblast hücrelerin jiro-fiberler ile kültürünün 4. gün canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) TCP, B) PGS, C) PXS, D) PGS-ko-PEG ve E) PXS-ko-PEG..... 115
- Şekil 4.69. Fibroblast hücrelerin jiro fiberler ile kültürünün 7. gün canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) TCP, B) PGS, C) PXS, D) PGS-ko-PEG ve E) PXS-ko-PEG..... 116
- Şekil 4.70. Fibroblast hücrelerin jiro-fiberler ile 7. gün SEM görüntüleri. A) PGS, B) PXS, C) PGS-ko-PEG ve D) PXS-ko-PEG..... 117
- Şekil 4.71. Keratinosit hücrelerin Gel-M hidrojellerde canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) 1 gün, B) 4 gün, C) 7 gün, D) 14 gün (ölçek:200 µm). .... 118
- Şekil 4.72. Fibroblast hücre canlılığına glikoz ve serumun etkisi. \* anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p<0.05$ ). .... 120
- Şekil 4.73. Keratinosit hücre canlılığına glikoz ve serumun etkisi. \*anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p<0.05$ ). .... 120
- Şekil 4.74. Serumun keratinosit, fibroblast hücreleri ve kokültür üzerine etkisi. \* anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p<0.05$ )..... 121
- Şekil 4.75. Fibroblast ve keratinosit hücrelerin jiro-eğrilmiş fiber destekli hibrid hidrojel doku iskelelerinde 1., 3. ve 5. gün floresan mikroskop görüntüleri (yeşil: fibroblast, kırmızı: keratinosit). .... 124

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Poli(poliol)sebakatların poliöl türüne göre sınıflandırılması .....	10
Çizelge 2.2. Hidrojellerin sınıflandırılması. ....	14
Çizelge 2.3. Doğal ve sentetik hidrojellerin uygulama örnekleri.....	17
Çizelge 2.4. Doku mühendisliği alanında kullanılan Gel-M hidrojellerin farklı özellikleri.....	18
Çizelge 2.5. Doku iskelesi üretim tekniklerinin avantaj ve dezavantajları .....	21
Çizelge 3.1. Poli(poliöl) sebakat (PPS) bazlı polimerlerin sentezinde kullanılan PEG, sebasit asit ve poliölün mol oranları. ....	39
Çizelge 4.1. Poli(poliöl) Sebakat (PPS) bazlı polimerlerin mekanik özellikleri.	60
Çizelge 4.2. PGS ve PGS-ko-PEG polimerlerinin–CH <sub>2</sub> ve –OH gruplarının FT-IR spektroskopisi piklerinin alan değerlerinin integrasyon oranları. ....	63
Çizelge 4.3. PXS ve PXS-ko-PEG polimerlerinin –CH <sub>2</sub> ve –OH gruplarının FT-IR piklerinin alan değerlerinin integrasyon oranları.....	71
Çizelge 4.4. Çapraz bağlanma süresinin polimerlerin fiziksel formlarına etkisi. ....	77
Çizelge 4.5. Fiber üretiminde kullanılan polimer çözeltilerin özellikleri. ....	92
Çizelge 4.6. PVA moleköl ağırlığının fiber oluşumuna etkisi. ....	103

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\sigma_M$	Elastik Modülüs
Et	Kopma Dayanımı
$\epsilon_B$	Kopma Noktasındaki Yüzde Uzama

### Kısaltmalar

ASTM	Amerikan Test ve Malzeme Derneği
ATR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma
ATTC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ECM	Ekstraselüler Matriks
EHD	Elektrohidrodinamik
DMEM	Dulbecco'nun Minimum Esansiyel Ortamı
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Transform Kızılötesi
Gel-M	Jelatin metakrilat
HA	Hyaluronik Asit
LCST	Alt kritik çözelti sıcaklığı
MD	Metakrilatlanma Derecesi
MTT	(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PCL	Poli(kaprolakton)

PEG	Poli(etilen glikol)
PEGDA	Poli(etilen glikol) diakrilat
PEG-PLA	Poli(etilen glikol)-poli(laktik asit)
PEG-PLA-PVA	Poli(etilen glikol)-poli(laktik asit)-poli(vinil alkol)
PES	Poli(eritritol)sebakat
PGA	Poli(glikolik asit)
PGS	Poli(gliserol)sebakat
PGS-ko-PEG	Poli(gliserol sebakat)-ko-poli(etilen glikol)
PHA	Polihidroksialkanoat
PHEMA	Poli(hidroksil-etil metakrilat)
PHEMA-MMA	Poli(hidroksil-etil metakrilat)-metil metakrilat
PLA	Polilaktik asit
PMS	Poli(mannitol)sebakat
PNIPAAm	Poli(N-izopropilakrilamit)
PU	Poliüretan
PPS	Poli(poliol)sebakat
PSS	Poli(sorbitol)sebakat
PVA	Poli(vinil alkol)
PXS	Poli(ksilitol)sebakat
PXS-ko-PEG	Poli(ksilitol sebakat)-ko-poli(etilen glikol)
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
TCP	Doku Kültür Kabı
TGA	Termal Gravimetrik Analiz
THF	Tetrahidrofuran
UV	Ultraviyole

# 1. GİRİŞ

Fonksiyonunu yitirmiş doku ve organ kayıplarının tedavisinde kullanılan birçok geleneksel yaklaşım vardır. Bunlar, (a) bir bireyden diğerine organ nakli ile ilgili cerrahi stratejiler veya aynı bireyin sağlıklı bir bölgesinden alınan ve hasarlı bölgeye nakledilmesi ile ilgili cerrahi stratejiler, (b) hasarlı doku ve organların fonksiyonunu yerine getirmek için mekanik cihazların kullanılması (örneğin; protez kalp kapakları, eklem implantları, diyaliz makineleri, vb) (c) farmakolojik destekleri içeren tıbbi stratejiler. Ancak uygun ve yeterli doku/organ bulunamaması, donör azlığı, organ reddi, kullanılan tıbbi cihazların zamana bağlı yıkımı veya implante edilen bölgeye uyum sağlamaması, kronik rejeksiyon gibi yaşanan sorunlar nedeni ile hala doku ve organ kayıpları günümüzde en büyük sağlık sorunudur. Bu ihtiyacı karşılamak için 1988 yılında A.B.D. Ulusal Bilim Vakfında (NSF) Y. C. Yung tarafından bir fikirle ortaya çıkmış ve 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından yayınlanan bir makale ile ilk bilimsel temelleri atılmıştır [1].

Doku Mühendisliği; fonksiyonunu yitirmiş veya zarar görmüş doku/organların yerine kullanılmak üzere, biyoloji ve mühendislik prensipleriyle laboratuvar ortamında doku/organ üretimini amaçlayan multidisipliner bir alandır [1]. Doku mühendisliğinin temel ilkesi, hasta veya donörden alınan hücrelerin biyouyumlu ve biyobozunur taşıyıcı matriks (doku iskelesi) üzerine ekilerek, uygun kültür ortamında üç boyutlu fonksiyonel dokuların geliştirilmesi ve bunların hasarlı dokuların onarımı için kullanılmasıdır. Günümüze kadar pek çok doku modelleri üzerinde çalışılmış olup deri, kıkırdak gibi doku mühendisliği ürünleri klinikte kullanıma girmiştir. Bu alanda önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen gerek hücre taşıyıcı matriksler gerekse üretim teknikleri alanındaki yaşanan sorunlar henüz çözülmemiştir. Hedef dokular için ideal doku iskeleleri geliştirilmesi üzerine çalışmalar halen devam etmektedir.

Doku iskelesi hücreler için fiziksel destek sağlayan ve aynı zamanda hücre gelişmesi (tutunması, organizasyonu, büyüme, çoğalma), farklılaşması ve



fonksiyonları açısından önemli görevlere sahip yapay bir hücre dışı matrikstir. Üç boyutlu doku oluşumunu destekleyen doku iskelelerinde kullanılan malzemeler ve tasarımları kritik öneme sahiptir. İdeal bir doku iskelesi; biyouyumlu, biyobozunur, hücrelerin çoğalması/doku oluşumu ve besinlerin ve metabolik atıkların taşınması için yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip, birbirine bağlı gözenek ağı ile üç boyutlu ve oldukça gözenekli yapıda olması gereklidir. Aynı zamanda üretimi ve sterilizasyonu kolay olmalıdır. Günümüzde fiber yapıdaki doku iskeleleri yüksek gözenek yapısı ve yüzey alanı ile bu kriterleri en iyi sağlayan yapılardır. Diğer taraftan doku iskelesi olarak, polimerler, seramikler, kompozitler veya bunların kombinasyonları ve aselüler dokular olmak üzere pek çok biyomalzeme kaynağı kullanılmıştır. Dokuların sahip olduğu mekanik özelliklere benzetim açısından polimerler diğer malzemelere göre daha çok ön plana çıkmaktadır. Ayarlanabilen mekanik özelliklerinin yanı sıra, polimerik malzemeler gerek hücre kültür ortamında gerekse vücut içinde fonksiyonlarını yerine getirdikten sonra kolaylıkla absorbe olabilmektedir. Biyobozunur polimerik biyomalzemelerde arasında polilaktik asit (PLA), poliglolik asit (PGA) ve bunların ko-polimerleri olan poli(laktik-glikolik asit) (PLGA), polikaprolakton (PCL) gibi poliesterler sıklıkla kullanılmaktadır [2]. Poliesterler hidrolize uğrayarak doğal metabolik yapıtaşlarına bozunabilir ve kolaylıkla vücut tarafından absorplanabilirler. Son yıllarda sebasik asit ile şeker alkollerinin (polioller) polikondenzasyon reaksiyonları ile elde edilen poli(poliol sebakat) (PPS) bazlı polimerler, gerek biyobozunur bir elastomer yapıda olmaları gerekse FDA onaylı olmaları nedeniyle bu alanda ilgi çekmektedir. Ancak bu polimerlerin sentezlerinin uzun olması ve üretimde yaşanan zorluklar bu polimerlerin medikal ve doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanımını kısıtlamaktadır.

Bu tez kapsamında biyobozunur, elastomerik poli(poliol) sebakat (PPS) bazlı polimerlerin mikro dalga tekniği ile sentezi, jiro fiberlerin üretimi ve bu fiberlerin UV ile muamele edilebilir metakrilatlanmış jelatin (Gel-M) hidrojel ile entegre edilerek fiber destekli hibrid doku iskelelerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla tezin ilk aşamasında poli(poliol) sebakat (PPS) bazlı (poligliserol sebakat (PGS), poliksilitol sebakat (PXS) ve bunların polietilen glikol (PEG) ile kopolimerlerinin sentezi planlanmıştır. Daha sonra sentezlenen polimerlerden

elektrodinamik tabanca düzeneği ve basınçlı jirasyon tekniği ile jiro-eğrilmiş fiberlerin üretilmesi ve iki tekniğin üretim açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın son bölümünde ise üretilen bu fiberlerin üzerine Gel-M hidrojinin uygulanarak, fiber destekli hibrid doku iskelelerin geliştirilmesi ve bu hibrid doku iskelelerinin 3 boyutlu fibroblast-keratinosit ko-kültürlerinin oluşturulmasında potansiyelleri değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Elastomerler

Elastomerler, çekme kuvveti uygulandığında yüksek miktarda uzama gösteren ve uygulanan kuvvetin kaldırılmasıyla başlangıç uzunluğuna dönen, çapraz bağlı kauçuk benzeri polimerlerdir. Bu özellikleri elastik davranışlarından kaynaklanmaktadır. Polimer zincirleri arasında bulunan çapraz bağ oranının az olmasının etkisiyle polimer zincirleri hareket edebilmektedir. Ayrıca çapraz bağların oluşmasıyla birlikte, elastomerlerin çözünmesi veya erimesi mümkün değildir. Amerikan Test ve Malzeme Derneği (ASTM) tarafından yapılan elastomer tanımına göre elastomerler; malzeme boyları 1.5 katına kadar esnetildikten sonra en az 1.25 katına kadar geri dönebilen ve 0.1 – 20 MPa arasında lineer bir gerilim-uzama grafiğine sahip olan malzemeler olarak tanımlanmıştır. Bunlara ek olarak biyomalzeme olarak kullanılan biyoelastomerler komşu ve çevre dokulara karşı biyouyumlu malzemeler olmaları gerekmektedir. Biyoelastomerler ancak bu koşullarda teşhis, tedavi, doku onarımı ya da yenilenmesi veya doku fonksiyonlarını iyileştirici uygulamalarda kullanılabilirler [3].

Elastomer malzemelerin biyomedikal alanda kullanımları 19.yy'ın sonlarında kauçuk endüstrisinin gelişmesiyle başlamaktadır. Çapraz bağlanmış kauçuk ilk olarak cerrahi eldivenlerde kullanılmaya başlanmıştır. Biyouyumlulukları, dayanıklılıkları, mekanik uyumları ve ekonomik üretimlerinden dolayı kardiyovasküler cihazlar, protezler, kateterler, ortodontik ve oftalmolojik uygulamalarda sıklıkla tercih edilen bir malzeme olmuştur. Biyobozunur elastomerler; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Sınıf III olarak kategorize edilmiş olup, doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı ise yaklaşık 100 yıl sonra başlamıştır [4].

Biyoelastomerler genel olarak vücutta kalış sürelerine bağlı olarak iki gruba ayrılırlar. Uzun süreli biyoelastomerler kullanım amacına uygun olarak vücut içinde yıllarca kalmak üzere tasarlanırken; kısa süreli biyoelastomerler ise implantasyon sonrasında önceden belirlenmiş bir zaman aralığında bozunma

yeteneğine sahiptirler. Doku mühendisliğindeki gelişmelerle birlikte biyobozunur elastomerler bu alanda önemli bir polimer sınıfı olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsan vücudundaki pek çok dokunun elastomerik özellik sergilemesinden dolayı deformasyon ve hasarların onarımı için biyobozunur elastomerik doku iskeleleri önemli avantajlara sahiptir [5].

Genel olarak biyomedikal elastomerler yüksek saflıkta ve uygulama alanlarına göre optimum fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklere sahip olmalıdırlar. Biyobozunur elastomerler için bozunma hızı doku rejenerasyonu ile uyumlu olmalı ve bozunma sonucu ortaya çıkacak kalıntılar herhangi bir irritasyon ya da enflamasyona yol açmamalıdır. Tüm biyobozunur elastomerler hidroliz olabilen bağlar içerir ve bu yüzden doku iskelelerinde bozunma; hidroliz ya da enzim katalizli hidroliz mekanizması ile ilerler. Çok az bir oranda oksidasyon üzerinden degradasyon da gerçekleşebilir. Çoğu biyoelastomer için pasif hidroliz bozunmada baskın mekanizmadır ve polimerin sahip olduğu kimyasal yapı, kristalinite, hidrofobiklik, pH değeri ve sıcaklık gibi yapısal ve çevresel faktörler tarafından etkilenir.

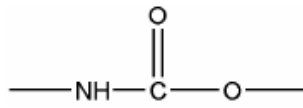
Polimerin kimyasal yapısı hidroliz hızını belirlemektedir ve genel olarak anhidrit ile esterler en kolay hidroliz olabilen bağlardır. Hidrolizlenme yeteneğinde bu bağları ester ve amitler izlemektedir [6]. Hidroliz, su moleküllerinin polimer zincirlerinin arasına girmesiyle gerçekleşen bir reaksiyon olarak düşünülebilir ve sonuç olarak hidrofilik polimerler yüksek su tutma kapasitelerinden dolayı hidrofobik polimerlere oranla çok daha hızlı hidrolize olabilirler.

Bozunma mekanizması, yüzey ve yığın bozunması olarak sınıflandırılabilir. Yüzey bozunması esnasında polimer implantın formu korunur ve çoğunlukla kontrollü ilaç salım sistemleri uygulamalarında kullanılan bir yaklaşımdır. Yüzey erozyonu ile ortama salınan ilaç miktarı kontrol altına alınmış olur [7]. Yığın bozunmada ise mekanik özellikler doğrudan değişeceği için bu tip biyoelastomer uygulamaları genellikle doku iskelelerinde kullanılır ve implantasyon bölgesinde yeni dokunun gelişmesi ile birlikte geçici polimerik elastomer bozunarak absorbe olur. Doku mühendisliği uygulamalarında geliştirilen sentetik biyoelastomer malzemelere örnek olarak poliüretanlar (PU), polihidroksialkanoatlar (PHA),

silikon elastomerler ve en son üyelerinden biri olarak da poli (poliol sebakat) türevleri verilebilir.

### 2.1.1. Poliüretanlar

Poliüretanlar, temel yapılarında üretan grubu (Şekil 2.1) içeren çok geniş bir polimer ailesidir. İlk kez 1937 yılında Alman bilim insanı Otto Bayer tarafından diizosiyanat (1,6-diizosiyonatoheksan) ile diol (1,4-bütandiol) tepkimesi ile sentezlenmiştir [8].



Şekil 2.1. Üretan grubu.

Poliüretanlar kimyasal bileşen olarak çok geniş çeşitliliğe sahip bir polimer ailesidir. Mekanik özellikleri, dokuya özgü biyouyumlulukları ile biyomedikal uygulamalarda en sık kullanılan sentetik polimer tipi olarak ön plana çıkmışlardır. İlk olarak kan torbaları, kardiyovasküler ve üriner kataterler olarak kullanılmaya başlanmıştır. Biyobozunur poliüretanlar ise 90'lı yıllardan itibaren sentezlenmeye başlanarak biyomedikal uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır.

Poliüretanlar genel olarak diizosiyanat ( $\text{O}=\text{C}=\text{N}-\text{R}_1-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ) ve diol ya da poliol içeren çoklu serbest terminal hidrosillere ( $-\text{OH}$ ) sahip bileşiklerin üretan bağı ( $-\text{NHCOO}-$ ) ile bağlanması ile elde edilir [9]. Sentezlenen polimer düşük mekanik dayanıma sahip olur ve zincir uzatıcıların kullanımı ile polimer zincirleri birbirlerine bağlanarak daha uzun poliüretan zincirleri elde edilir. Zincir uzatıcılar diol ( $\text{HO}-\text{R}-\text{OH}$ ) veya diamin ( $\text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{NH}_2$ ) fonksiyonelliğine sahip olabilir ve eğer diamin kullanılır ise elde edilen polimer “poliüretan üre” olarak isimlendirilir. Poliol zincirleri (polieter ya da poliester) yumuşak segmentleri oluştururken, diizosiyanat ve zincir uzatıcının bulunduğu bölgeler sert segmentleri oluştururlar. Yumuşak segmentler amorf yapıda olup, polimere kauçuğumsu özellik ve düşük camsı geçiş sıcaklığı sağlarlar. Üretan kısımlar ise polimere sertlik sağlar.

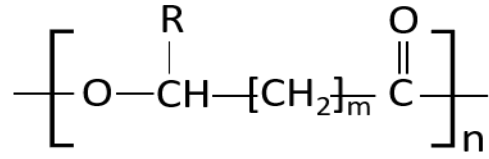
Poliüretanlar genel olarak iyi biyoyumluluğa sahip olup fibroblast ve endotel hücreler gibi sitotoksikite testlerinde sıklıkla kullanılan hücreler ile çoğunlukla olumlu sonuçlar vermişlerdir [10]. Ancak uzun dönem biyoyumluluk çalışmalarında bazı dezavantajlara sahip olduğu rapor edilmiştir. Özellikle aromatik diizosiyanat kullanılan poliüretanların potansiyel karsinojen olduklarına dair çalışmalar literatürde mevcuttur [11, 12]. Degradasyon ürünleri izosiyanatlar olmasa da polimerik biyomalzeme içinde reaksiyona girmemiş ve uzaklaştırılmamış eser miktarda serbest izosiyanat monomer kalıntıları toksisite açısından risk oluşturmaktadır. Bu yüzden biyomedikal uygulamalarda lizin diizosiyanat ve bütil diizosiyanat gibi düz zincirli diizosiyanatlar aromatik izosiyanatların yerini almışlardır. Bu diizosiyanatlar kullanılarak sentezlenen poliüretanlar ile gerçekleştirilen çalışmalarda immün cevap oluşumu ya da doku ölümü rapor edilmemiştir [13]. Biyoyumluluklarına ek olarak poliüretanlar, sert/yumuşak segment oranının ayarlanması ve oldukça geniş polidiol/poliester ve zincir uzatıcı seçimleri ile farklı mekanik özelliklere sahip olarak sentezlenebilirler [14, 15].

### **2.1.2. Polihidroksialkanoatlar**

Polihidroksialkanoatlar (PHA) özel üreme ortamlarında değişik türlerde Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmalar tarafından sentezlenirler [16]. Bu karbon zengini üreme ortamlarında besiyerleri amonyum, potasyum, sülfat, magnezyum ve fosfat gibi temel nütrientler yoksundur. Bu ortamda üreyen bakteriler fazladan karbon kaynağını hücrelerinde depolamaya başlarlar ve kuru hücre ağırlığının %90'ına kadar depolama gerçekleştirebilir [17].

Günümüze kadar R grubu farklı 150'nin üzerinde hidroksialkanoat polimeri bakteriyel kaynaklardan izole edilmiştir [18]. Poli 3-hidroksibütirat (P3HB) en fazla çalışılmış ve üretilmiş ve karakterize edilmiş PHA türü olarak ön plana çıkmaktadır [19]. Diğer doğal biyopolimerler gibi P3HB de yüksek biyoyumluluğa sahiptir ve hayvan hücrelerinin membranlarında yaygın olarak bulunmaktadır [20]. P3HB'nin bozunma ürünü olan 3-hidroksibütirik asit de beyin, karaciğer, böbrek gibi dokularda da bulunan bir metabolit olarak yer almaktadır [21]. Öte yandan PHA'ların bakteriyel bir fermentasyon ürünü olarak yer almasından dolayı

protein gibi doğrudan bakteriyel ya da yüzey aktif malzemeler gibi özütleme işlemi artıklarını pirojen etki göstererek inflamasyon cevabı oluşturabilmektedir. Kısa dönem biyoyumluluklarının değerlendirildiği çalışmalarda PHA elastomerlerin iyi sitoyumluluğa sahip oldukları, bozunma ürünlerinin genel olarak hücre canlılığını negatif yönde etkilemediği ancak hayvan deneylerinde oldukça fazla sayıda inflamasyon reaksiyonu geliştirme potansiyeline sahip oldukları rapor edilmiştir [22].



Şekil 2.2. Polihidroksialkanoatlar.

PHA'ların mekanik özellikleri de yan zincirlerin çeşitliliğine ve ester bağları arasındaki uzaklığa göre kırılma türden, sentetik kauçuğa kadar geniş bir ölçekte farklılık göstermektedir (Şekil 2.2) [23]. Kısa yan zincirlere sahip PHA'lar daha kristalin ve kırılma bir karaktere sahipken; yan zincir uzadıkça polimer yumuşak ve elastik bir hale gelmektedir. Polimerlerin kristalinitelerine bağlı olarak termoplastik elastomer özellikleri de farklılık göstermektedir [24]. Artan kristalinite beraberinde sert ve kırılma bir yapı getirdiğinden dolayı yüksek kristalin PHA'lar doku mühendisliği uygulamalarına uygun polimerler değildir.

### 2.1.3. Silikon Elastomerler

Silikon elastomerler silisyum-oksijen bağının tekrar edildiği sentetik polimerlerdir ve silisyuma bağlı olan grupların değişimi ile farklılık gösterirler. Silisyuma bağlı olan R grubu sadece metil ya da vinil, fenil, siyanoalkil, hidroksil veya alkoksi gibi farklı türlerde olabilir [25].

Si-O-Si bağının reaktif olmamasından ve biyolojik olarak bozunmamasından dolayı silikon implant malzemeleri biyolojik olarak inert ve non-toksik olarak kabul

edilmektedir [26]. Silikon elastomerler başta sert doku ve ortopedik uygulamalar olmak üzere çeşitli implantlarda kullanılmakla beraber, diyaliz, oksijenatör ve bypass cihazları gibi harici biyomedikal uygulamalarda ve dermal tabakalar, yanık örtüleri ve estetik implantlarda kullanılmaktadırlar.

#### **2.1.4. Poli(poliol)Sebakatlar**


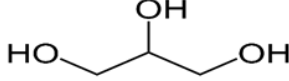
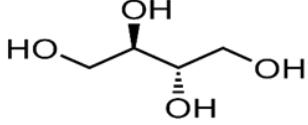
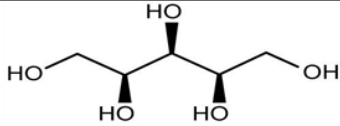
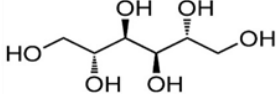
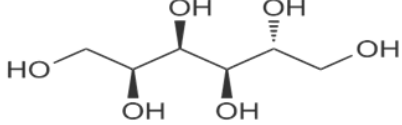
Poli(poliol sebakat) (PPS) türevleri sebasik asit ile şeker alkollerinin (polioller) polikondenzasyon reaksiyonları ile tepkimeye girmesi sonucunda elde edilen poliester elastomer yapılarıdır ve ilk defa Langer ve ark. tarafından medikal uygulamalarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir [5]. PPS'ler sentezlerinde kullanılan poliollerin türüne göre adlandırılırlar. Yiyecek endüstrisinde kullanılan gliserol, ksilitol, sorbitol, mannitol gibi şeker alkollerini kullanılarak hazırlanan türlerin her biri PPS'lerin bir alt türünü oluşturur (Çizelge 2.1). Türevlendirilen poli(poliol) sebakatların yapı taşları olan sebasik asit, gliserol, ksilitol ve sorbitol Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından medikal uygulamalarda kullanılabilirlikleri konusunda onaylanmıştır. FDA tarafından onaylanan bir diğer polimer olan PLGA'ya göre de bozunurken şişme göstermez ve çok daha az enflamasyon ve fibröz doku oluşumuna yol açarlar [27, 28].

PPS sentezi genellikle iki basamakta gerçekleşmekte olup ilk basamak ön polimerizasyon olarak adlandırılmakta ve sebasik asit ile şeker alkolünün tepkimesi sonucu oluşan jel benzeri yapının ortaya çıkması ile sonlanmaktadır. Bu reaksiyon, poliölün türüne göre 110 ile 140 °C arasındaki sıcaklıkta ve 4 ile 24 saat arasında gerçekleşir. Esterifikasyon tepkimesi esnasında şeker alkolündeki primer hidroksiller ile sebasik asitin karboksil grupları arasında ester bağı oluşur ve ön polimer olarak adlandırılan öncül zincirler elde edilmiş olur. İkinci basamakta ise birinci basamakta oluşturulan şartlar vakum esnasında tekrarlanarak daha fazla hidroksil grubunun serbest karboksilik asit grupları ile etkileşmesi ve yapıyı çapraz bağlaması sağlanır. Çapraz bağlanan polimer eriyik hale gelemez ya da çözücüler tarafından çözülemez. Ancak ön polimer tetrahidrofur, dioksan, *N,N*-dimetilformamid gibi organik çözücülerde çözünerek ya da eriyik hale getirilerek kalıplara dökülmesi ile farklı geometrilerde polimerik malzemelerin eldesi mümkündür.



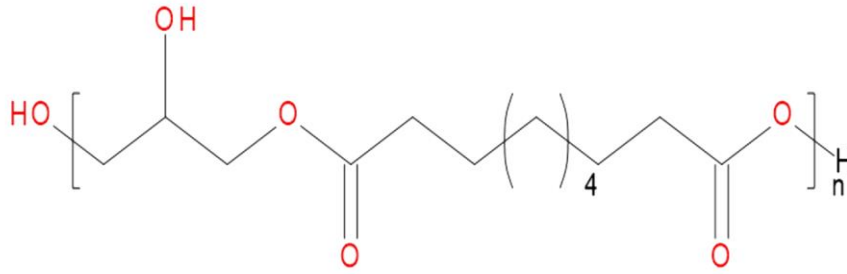
Yukarıda bahsedildiği üzere PPS'ler biyoyumlu, biyobozunur ve değiştirilebilen mekanik özellikleriyle biyomedikal teknolojilerde yakın geçmişte kullanılan biyoelastomer yapıda poliesterlerdir. Yiyecek endüstrisinde kullanılan şeker alkollerini ve doğal bir ürün olan kاستor yağından elde edilen sebakik asit bileşenleri ile toksik özelliğe sahip değildirler. Yapılan çalışmalar incelendiğinde poli(poliol) sebakat sentez çalışmalarında poliol kaynağı olarak genellikle gliserol kullanıldığı göze çarpmaktadır. Kullanılan poliölün zincir uzunluğu, molekül ağırlığı, hidroksil gruplarının sayısı v.b. özelliklerine bağlı olarak elde edilen poli(poliol) sebakat polimerinin mekanik özellikleri farklılık göstermektedir [29].

Çizelge 2.1. Poli(poliol)sebakatların poliöl türüne göre sınıflandırılması [4].

Şeker Alkol Türü	Molekül yapısı	PPS
Glikol (2C)		PES
Gliserol (3C)		PGS
Eritritol (4C)		PES
Ksilitol (5C)		PXS
Mannitol (6C)		PMS
Sorbitol (6C)		PSS

## Poli(gliserol)sebakat (PGS)

Gliserol ve sebasik asitin kondenzasyon polimerizasyonu ile sentezlenen poli(gliserol)sebakat (PGS) kısa süre içerisinde biyomalzeme alanında kullanılmaya başlanmıştır [30]. Poli(poliol)sebakatlar arasında PGS (Şekil 2.3) en sık çalışılan tür olmuştur. Özellikle bu polimerin biyoyumlu olması, biyobozunur olması ve aynı zamanda degradasyonunun enzimatik ve hidrolitik olarak gerçekleşmesi, bozunma ürünlerinin toksik etki yaratmaması medikal alanda öne çıkan özellikleridir.



Şekil 2.3. PGS polimer yapısı.

PGS biyomalzeme ve doku mühendisliği uygulamalarında mekanik özellikleri sebebiyle özellikle kıkırdak, kalp kası, sinir doku mühendisliği, kan damarları vb. yumuşak doku uygulamalarında başarı ile kullanılmaktadır. Ayrıca kullanım alanının çeşitlendirilebilmesi için PGS temelli harman yapılar ve/veya kopolimer yapıların kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur [31-33]. Biyoyumlu ve biyobozunur özellikteki poli(poliol) sebakat yapılarının sentezi literatürde ilk defa Wang ve ark. tarafından geleneksel kondenzasyon polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir [34].

PGS'in bozunma hızı mol oranları ve çapraz bağlanma yoğunluğuyla kontrol edilebilir. Çapraz bağlanma yoğunluğu reaksiyonun ikinci basamağında sıcaklık ve süre ile doğru orantılı olarak arttırılabilmektedir. PGS'in *in vitro* çalışmalarda sergilediği bozunma profiline göre hidrolitik olarak 2 aylık bir sürede %10 – 25 oranında bozunduğu rapor edilmiştir. Ancak *in vivo* çalışmalarda bu sürenin çok daha kısa olabileceğine dair bulgular da vardır. 37 °C'de PBS içinde çalkalanarak bozunma oranı izlenen PGS %17 ±6 oranında ağırlığını kaybederken hayvan

uygulamasında aynı sürede tamamen absorbe olmuştur [35]. Canlı vücutta enflamatuar hücreleri tarafından salgılanan enzimler veya doğrudan makrofajlar tarafından parçalanan polimer bağları bozunma işlemi katalizler ve *in vivo* bozunmanın çok daha kısa sürede gerçekleşmesini sağlamaktadır. Wang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen *in vivo* çalışmada sıkışma modülüsünün bozunma ile lineer olarak azaldığı görülmüş ve bu yüzden bozunma mekanizmasının yüzeyden gerçekleştiği bildirilmiştir [34]. PGS implantın şekli korunmuş, PLGA örneklerinde olduğu gibi geniş çaplı bir deformasyon gözlenmemiştir.

Literatürde PGS'in Young's modulus değerinin 0.056–1.5 MPa arasında değiştiği ve %40 – 450 arasında uzamaya sahip olduğu belirtilmiştir. PGS'nin Young's modulus değeri  $0.282 \pm 0.025$  MPa, çekme uzaması  $\% 267 \pm 59.4$  ve çekme direnci de 0.5 MPa olarak rapor edilmiştir [33-35]. Liu ve arkadaşları, PGS'nin mekanik dayanımının bileşenlerin mol oranları ve reaksiyon koşulları ile değiştiğini ve bunun sonucu olarak elastikiyet, bozunma ve termal işleme özellikleri farklı malzemelerin üretilebileceğini göstermişlerdir [36]. Bu özellikleri PGS'nin deri, kas ve ligament doku mühendisliği uygulamaları için yüksek potansiyel taşıdığını göstermektedir.

### **Poli(ksilitol)sebakat (PXS)**

PXS polimeri, PGS'den sonra en fazla çalışılan poli(poliol)sebakat türevi olarak öne çıkmaktadır. PXS'de gliserolün yerini ksilitol almıştır ve artan hidroksil oranı ile çapraz bağlanma derecesi daha yüksektir. PXS'nin biyouyumluluğuna dair gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda malzemenin biyobozunur medikal implant ve cihaz üretiminde umut vadeden özellikte olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca monomer mol oranlarının polimer üzerine etkisi incelendiğinde; PXS biyoelastomerinin camsı geçiş sıcaklığı, ksilitol:sebasik asit mol oranının 1:1 ve 1:2 olduğu durumlarda 7.3 ve 22.9 °C olarak bulunmuştur ve vücut içi uygulamalar için uygun olarak kabul edilmiştir. Mol oranı 1:1 olan biyoelastomerin Young's modulus değeri 0.82 MPa olarak hesaplanırken, 1:2 oranında sentezlenen örnekte bu değer 5.33 MPa'a çıkmıştır. Kopma anındaki uzama ve çekme dirençleri de sırasıyla 1:1 mol oranı için  $\% 205.2$  ve 0.61 MPa; 1:2 mol

oranı için ise % 33.1 ve 1.43 MPa olarak rapor edilmiştir. Mol oranlarındaki değişim bozunma hızlarını da etkilemekte olup, 1:1 mol oranına sahip örnekler *in vivo*'da 7 hafta içinde tamamen absorbe olurken; 1:2 mol oranına sahip örneklerde ise 28 hafta sonra kütle kaybı olmadığı görülmüştür. Bozunma süresi mol oranı ve çapraz bağlanma yoğunluğu ile ayarlanabilen PXS polimeri hem kısa hem de uzun dönem implantasyon uygulamaları için kullanılabilir olduğu belirlenmiştir [37].

## 2.2. Hidrojeller

Hidrojeller, çapraz bağlı polimer zincirlerinden oluşan, ağısı yapıda ve yüksek oranda su tutma kapasitesine sahip makromoleküler üç boyutlu yapılardır. Hidrojeller, yüksek su içerikleri, yumuşaklık, esneklik ve biyouyumluluk gibi özellikleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir destek malzemesidir. Hidrojellerin canlı dokularla benzerlikleri biyomalzeme uygulamaları için birçok fırsat yaratmaktadır. Günümüzde hidrojeller, kontakt lens, hijyen ürünleri, doku iskeleleri, ilaç salım sistemleri, yara ve yanık örtü malzemelerinin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır.

Hidrojeller su tutma ve şişme özelliklerine bağlı olarak, yüksek sıvı içerikleriyle hücre dışı matriksi başarı ile taklit etmektedir. Hidrojellerin eldesinde kullanılan çapraz bağlanma yöntemleri arasında kovalent bağlanma, iyonik etkileşim, fonksiyonel akrilat gruplarının uv ışınları ile çapraz bağlanması çoğunlukla kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır [38]. Ayrıca hidrojel sistemlerinin dinamik kovalent bağlar sayesinde; mekanik deformasyonlara karşı direnç, yenilenme gösterebildiği, fizyolojik koşullarda kendiliğinden düzenlenebilen ve kendini yenileyebilen uygulamaları da son yıllarda popülerlik kazanmıştır. Ekstrasellüler matriksteki biyomakromoleküllerden ilham alınarak tasarlanmış birçok hidrojel yapı vardır. Doku iskelesi olarak kullanılan hidrojeller çeşitlerine göre farklı başlıklar altında sınıflandırılabilir (Çizelge 2.2).

Hidrojellerin sınıflandırılması sırasında başlıca ve en önemli özellik hidrojeli oluşturan polimerik yapının kaynağıdır. Doğal, sentetik ya da yarı sentetik olarak sınıflandırılan hidrojellerin kendine özgü avantajlara sahiptirler.

Çizelge 2.2. Hidrojellerin sınıflandırılması [38].

Hidrojellerin Sınıflandırması					
Kaynak	Dayanıklılık	Uyaran cevabı	Yük	Yapı	Kompozisyon
Doğal	Dayanıklı	Akıllı	Katyonik	Amorf	Homopolimer
Sentetik	Bozunur	Geleneksel	Anyonik	Yarı kristal	Kopolimer
-	-	-	Nötral	-	Yarı-geçişimli ağ
			Amfolitik		

### 2.2.1. Doğal Kaynaklı Hidrojeller

Doğal kaynaklı hidrojeller, polisakkarit ya da protein temelli hidrojeller olarak iki alt başlıkta incelenebilir. Çeşitli hidrojellerin hazırlanması için önerilen sayısız polimer türlerinden biri olan polisakkaritler, biyomedikal uygulamalarda uzun süredir kullanılan malzemeler arasındadır. Bozunan polimer zincirlerinden ortaya çıkan monomer kalıntılarının canlı sistemlere toksik etki göstermemesi, suda çözünebilirlikleri, yüksek şişme kapasiteleri ve çok çeşitli fonksiyonel gruplar üzerinden basit kimyasal modifikasyonlara açık olmaları en önemli avantajlarıdır. [39, 40]. Aynı zamanda polisakkarit temelli hidrojeller, insan vücudundaki enzimatik olaylar ile biyobozunurlar. Polisakkarit malzemelere örnek olarak aljinat, kitosan, karragenan, gellan, ksantan, selüloz, agar ve pektin sayılabilir.

Protein yapılardan elde edilen hidrojeller, hücre dışı matriks ile yapısal, mekanik ve kimyasal benzerlik gösterir ve biyolojik uyumlulukları yüksektir. Bunlara ek olarak, protein temelli hidrojeller vücutta proteolitik enzimler ile toksik olmayan yapı taşlarına bozunabilme özelliklerine sahiptirler. Bu nedenlerden dolayı, protein temelli hidrojeller çok yönlü malzemeler olarak sınıflandırılmaktadır [41]. İpek fibroin, kolajen, jelatin, fibrin, elastin, keratin başta olmak üzere çoğunluğu fibriler protein yapılar sıklıkla protein temelli hidrojel çalışmalarında tek başına ya da bileşen olarak kullanılmaktadır. Doğal hidrojeller biyoaktif yapıda olduklarından doğal adezyon bölgelerine sahiptir.

Günümüzde polisakkaritler ve proteinlerden oluşan yapılar, kontrollü ilaç salım ve gen taşıyım sistemlerinde ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere sıklıkla modifiye edilmektedir. Doğal, yenilenebilir, toksik olmayan ve biyobozunur kaynaklardan geliştirilen polisakkarit bazlı hidrojeller, “çevre dostu” ürünler olarak görülmektedir.

### **2.2.2. Sentetik Kaynaklı Hidrojeller**

Sentetik polimerik hidrojeller, biyomedikal alanda sıklıkla kullanılan ve sürekli geliştirilen bir biyomalzeme grubudur. Sentetik hidrojeller genellikle poli (hidroksialkil metakrilat), poli (akrilat), poli (akrilik asit), poli (akrilamit), poli (metakrilamit), poli (vinilpirolidon) ve poli (vinil alkol) türleri ve türevleri ile sentezlenmektedir [42]. Bunlar yüksek su tutma kapasiteleri, uygun jel kuvveti ve yüksek ölçekte düşük maliyette üretim gibi avantajlar sergilemektedir.

Sentetik hidrojeller sentez sırasında sıcaklık, kimyasal konsantrasyon ve çevresel etmenlerin kontrolü ile düzenlenebilmektedir. Ayrıca zamana bağlı olarak hidrolize olabilen ve/veya biyobozunur yapı kompozisyonları da düzenlenebilmektedir. Ancak hücrelerin hidrojel yapılarına tutunması, yayılması, göç etmesi ve çoğalabilmesi için hücre adezyon moleküllerine sahip olması gerekmektedir. Sentetik yapılar adezyon moleküllerinin kovalent aşılınması, adsorpsiyonu veya elektrostatik etkileşimleri ile biyoaktif hale getirilmektedir. Doğal ve sentetik kaynaklı hidrojeller ve uygulama alanları ile ilgili bazı örnekler Çizelge 2.3'te verilmiştir.

### **2.2.3. Yarısentetik Hidrojeller**

Doğal polimerlerin mekanik özelliklerinin düşük ve sınırlı olması nedeniyle makromoleküler yapının sentetik polimerlerle desteklenmesi gerektiğinden yarı sentetik olarak adlandırılan hidrojeller ortaya çıkmıştır. Bu tip hidrojeller arasında kollajen-akrilat, alginat-akrilat, PLGA-ko-serin, PEG-ko-peptitler, alginat-g-(PEO-PPO-PEO), kitosan-g-(PEO-PPO-PEO) gibi hidrojel sistemleri medikal uygulamalarda geniş olarak yer almaktadır. Mevcut hidrojeller arasında son

yıllarda 3-boyutlu yazıcı sistemlerde sıklıkla kullanılması nedeniyle jelatin metakrilat (Gel-M) hidrojeller oldukça fazla ilgi toplamıştır. Bu tez çalışmasında da jelatin metakrilat jelin kullanılması nedeniyle bu bölümde jelatin metakrilata yer verilmiştir.

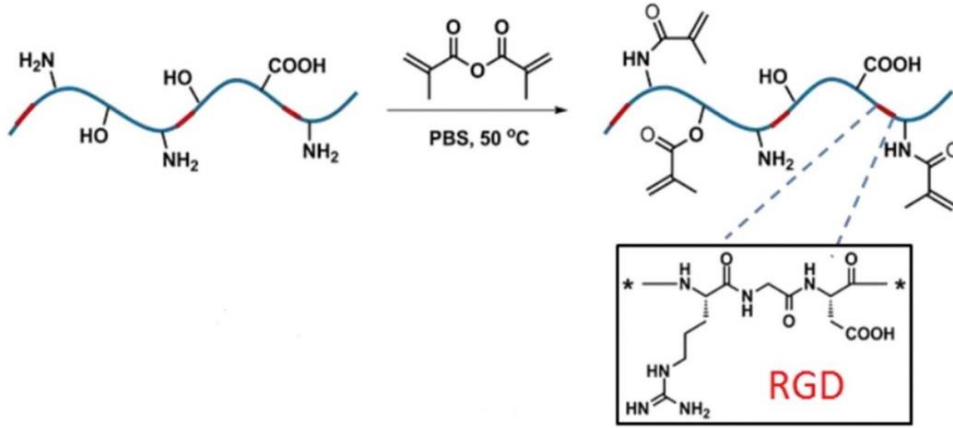
Jelatin bazlı hidrojeller uygun biyolojik ve ayarlanabilir fiziksel özellikleri nedeniyle sıklıkla birçok biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Hücre dışı matriksin en önem bileşenlerinden biri olan, kolajenin hidroliz ürünü olan jelatin hücre tutunmasını sağlayan arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) sekansını yapısında barındırır [43]. Doğal kaynaklı bir bileşen olan jelatinin sentetik modifikasyonu ile üretilen jelatin metakrilat (Gel-M) hidrojeli her iki hidrojel türünün de avantajlarını barındırmaktadır. Gel-M hidrojel sahip oldukları hücre tutunma ve matriks metalloproteinaz duyarlı peptid motifleri sayesinde hücre tutunma, çoğalma ve yayılmasına uygundur ve bu özelliklerinden dolayı hücre dışı matriks yapılarına büyük benzerliklere taşırlar [44]. UV ışını ile çapraz bağlanabilme yeteneklerinden dolayı istenilen formda üretilebilirler, çapraz bağlanabilir uçların yoğunluğu ve Gel-M konsantrasyonu sayesinde de mekanik özellikleri tümüyle kontrol edilebilir [45]. Kolajen ile karşılaştırıldığında ise daha fazla çözünürlük ve daha az antijenlik özellikleri ön plana çıkar. Gel-M çözeltileri, UV ışık ve fotobaşlatıcı varlığında kovalent olarak çapraz bağlanmış ağ yapıları oluşturmak üzere radikal polimerizasyon tepkimelerine girer. Gel-M hidrojeli bu özelliği sağlayan metakrilat grupları, metakrilik anhidritin jelatindeki özellikle lizin uçlarındaki amino grupları ve hidroksil uçları ile doğrudan tepkimeye girmesiyle gerçekleşir [46]. Reaksiyon jelatinin tümüyle suda çözünebilir olduğu 45°C ve yukarıdaki sıcaklıklarda ve pH 7.4'te gerçekleşir (Şekil 2.4). Jelatinin ve metakrilik anhidrit oranının değiştirilmesi ile jelatinin metakrilatlanma oranı kontrol altında tutulabilir ve dolayısıyla aynı derişimde Gel-M ile farklı fiziksel özelliklere sahip hidrojellerin sentezi mümkündür [64].

Çizelge 2.3. Doğal ve sentetik hidrojelilerin uygulama örnekleri [38].

DOĞAL		SENTETİK	
Polimer	Uygulama alanı	Polimer	Uygulama alanı
Hyaluronik asit (HA)	Deri, damar, kemik vb. [47]	PEG-PLA	Kemik [48]
Fibrin	Kıkırdak, deri, kardiyovasküler vb. [49, 50]	PEG	Kemik, kıkırdak, kardiyovasküler, damar vb. [51]
Aljinat	Kıkırdak, deri, kemik, vb.[52, 53]	PEGDA	Damar, kıkırdak [54]
Kolajen	Kıkırdak, deri, sinir, omurilik vb. [55]	PLA-PEG-PLA	Kıkırdak, pankreas [56]
Peptit amfifil	Kemik, kıkırdak vb. [57]	PEG-PLA-PVA	Kıkırdak
Kondroitin sülfat	Kemik, kıkırdak vb. [58]	PHEMA-MMA	Sinir [59]
Kitosan	Kemik, deri vb. [60]	PVA	Kıkırdak [61]
Gelatin	Damar, deri, vasküler, kıkırdak, sinir vb. [62]	PHEMA	Göz, iskelet kası, omurilik vb. [63]

Gel-M hidrojelers biyouyumlulukları, biyobozunabilirlikleri, sitotoksik ve immunojenik cevaplarının olmaması gibi temel avantajlarının yanısıra ayarlanabilir mekanik ve bozunabilme özellikleri ve farklı bileşenler ile harmanlanabilme yetenekleri sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında sayısız çalışmada kullanılmışlardır. Bu çalışmalar Çizelge 2.4'te özetlenmiştir.





Şekil 2.4. Jelatinin metakrilik anhidrit varlığında metakrilatlanma reaksiyonu (hücre tutunmasında rol oynayan RGD sekansı [43]).

Çizelge 2.4. Doku mühendisliği alanında kullanılan Gel-M hidrojellerin farklı özellikleri.

Nöral [41]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elektriksel iletkenlik (iletken bileşenler ile)</li> <li>• Ayarlanabilir sertlik</li> </ul>
Deri [65]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elastik mekaniksel özellik</li> <li>• Ayarlanabilir biyobozunma</li> </ul>
Vasküler [66, 67]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-trombojenite</li> <li>• Mekanik dayanım ve elastiklik</li> <li>• Hücre yönlenmesi</li> <li>• Endotelizasyon</li> </ul>
Kas [68, 69]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek mekanik dayanım</li> <li>• Hücre yönlenmesi</li> </ul>
Kardiyak [70]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek mekanik dayanım</li> <li>• Hücre yönlenmesi</li> <li>• Elektriksel iletkenlik (iletken bileşenler ile)</li> </ul>
Kıkırdak [71]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek sıkışma direnci</li> <li>• Ayarlanabilir mekanik dayanım</li> <li>• Ayarlanabilir hücre yönelmesi</li> </ul>
Kemik [72, 73]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek mekanik dayanım</li> <li>• Osteojenik farklılaşma</li> <li>• Osteointegrasyon</li> <li>• Biyomineralizasyon</li> </ul>
Karaciğer [74]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek gözeneklilik</li> <li>• Vaskülerizasyon</li> </ul>

## 2.2.4. Jelleşme Türlerine Göre Hidrojeller

Hidrojel yapılarının çözelti formundan jel haline geçmelerini sağlayacak jelleşme diğer bir deyiş ile çapraz bağlanma türleri aşağıdaki alt başlıklarda özetlenmiştir. Çapraz bağlanma, jellerin *in vitro* ortamda hazırlanırken, ya da biyomedikal uygulama esnasında vücut içine enjekte edilmesinin ardından *in vivo* olarak gerçekleşebilirler.

### 2.2.2.1. Fiziksel Çapraz Bağlanan Hidrojeller

Hidrojel yapılarının fiziksel olarak jelleşmesine neden olan etmenler pH, sıcaklık gibi fiziksel uyaranlardır. Sıcaklık duyarlı jelleşen polimerler arasında en çok bilinen poli (*N*-izopropilakrilamit) (PNIPAAm) olarak öne çıkmaktadır. PNIPAAm, biyobozunur bir yapıya sahip olmamakla beraber, sulu ortamda alt kritik çözelti sıcaklığında (32 °C) (LCST) keskin bir faz geçişi göstermektedir [75, 76]. LCST sıcaklığının altında, esnek ve genişlemiş sarmal konformasyona sahip olan PNIPAAm, LCST sıcaklığına hidrofobik hale geçerek polimer zincirleri çöker/agregasyon oluşur [77]. PNIPAAm'ın hidrofilik polimerler ile kopolimerlerinin sentezlenmesiyle polimer-su etkileşimi artırılarak LCST değerinin yükselmesi mümkündür. Diğer yandan daha hidrofobik polimerler ile kopolimerizasyon sonucu daha düşük LCST değerine sahip polimerler de hazırlanabilmektedir [78]. PNIPAAm hidrojeller ilaç taşıyıcı sistemler [79], hücre enkapsülasyonu/taşınımı [80] ve hücre kültür yüzeyleri [81] olarak biyomalzeme uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

### 2.2.2.2. Kimyasal Çapraz Bağlanan Hidrojeller

Hidrojellerin kimyasal olarak çapraz bağlanmaları, polimer zincirleri arasında doğrudan ya da çapraz bağlayıcı moleküller yardımı ile kovalent bağların kurulması ile gerçekleşir. Kimyasal jelleşmede sıklıkla kullanılan yaklaşımların başında fotopolimerizasyon ile çapraz bağlanma gelmektedir. Fotobaşlatıcıların UV ışın varlığında bozularak oluşturdukları serbest radikaller üzerinden ilerleyen reaksiyonda polimerik zincirlerdeki akrilat ve metakrilat gibi bölgeler çapraz bağlanarak ağ yapısını oluşturur. Fotoçaprazbağlanan polimerlere poli(etilen glikol diakrilat), poli(etilen glikol dimetakrilat), poli(propilen fumarat) [82, 83] gibi

sentetik bileşikler ile son yıllarda akrilat ve metakrilat uçlar ile modifiye edilmiş dekstran, aljinat, jelatin ve hyaluronik asit [84, 85] gibi doğal protein-polisakkarit yapıların türevleri örnek olarak verilebilir.

Sulu çözeltilerde gerçekleşebilen organik tepkimelerden biri olan Michael katılması tepkimelerinde ise tiyol ve akrilat ya da vinil sülfon fonksiyonel grupları arasında reaksiyonlar gerçekleşir. Oda sıcaklığında ve fizyolojik pH'da gerçekleşen bu tepkimelere örnek olarak tiyol ile fonksiyonellendirilmiş hyaluronik asit ve poli (etilen glikol dimetakrilat) yapıların adipoz doku kök hücre ve fibroblast hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmaları örnek olarak gösterilebilir [86].

Hidrojel oluşturulan farklı bileşenlerin amino ve aldehit grupları arasında ek bir kimyasal çapraz bağlayıcıya gereksinim duymadan karbon azot çift bağı oluşturan bir reaksiyon olan Schiff bazı reaksiyonu, tersinir bir kimyasal jelleşme metodu olarak sayılabilir. Hyaluronik asit, dekstran ve kondroitin sülfat gibi kısmen oksitlenmiş polisakaritlerin sahip oldukları aldehit grupları, hidrojel oluşturmak üzere N-süksinil-kitosan, karboksimetil kitosan ya da jelatin gibi amino grupları içeren diğer doğal veya poli etilen imin gibi sentetik ve suda çözünen polimerler ile reaksiyona girebilir [87].

### **2.3. Doku İskelesi Üretim Teknikleri**

Doku iskeleleri; dondurarak-kurutma, faz ayırma, katı serbest form, elektroegirme, ıslak egirme, mikrobaloncuk oluşturma, kalıp tabanlı üretim, 3-boyutlu yazım, kendiliğinden düzenlenen yapılar vb. teknikler ile sünger, elyaf, fiber, jel, mikro/nano poröz vb. formlarda geliştirilmektedir. Doku iskelesi üretim yöntemleri, avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.5'de belirtilmiştir.

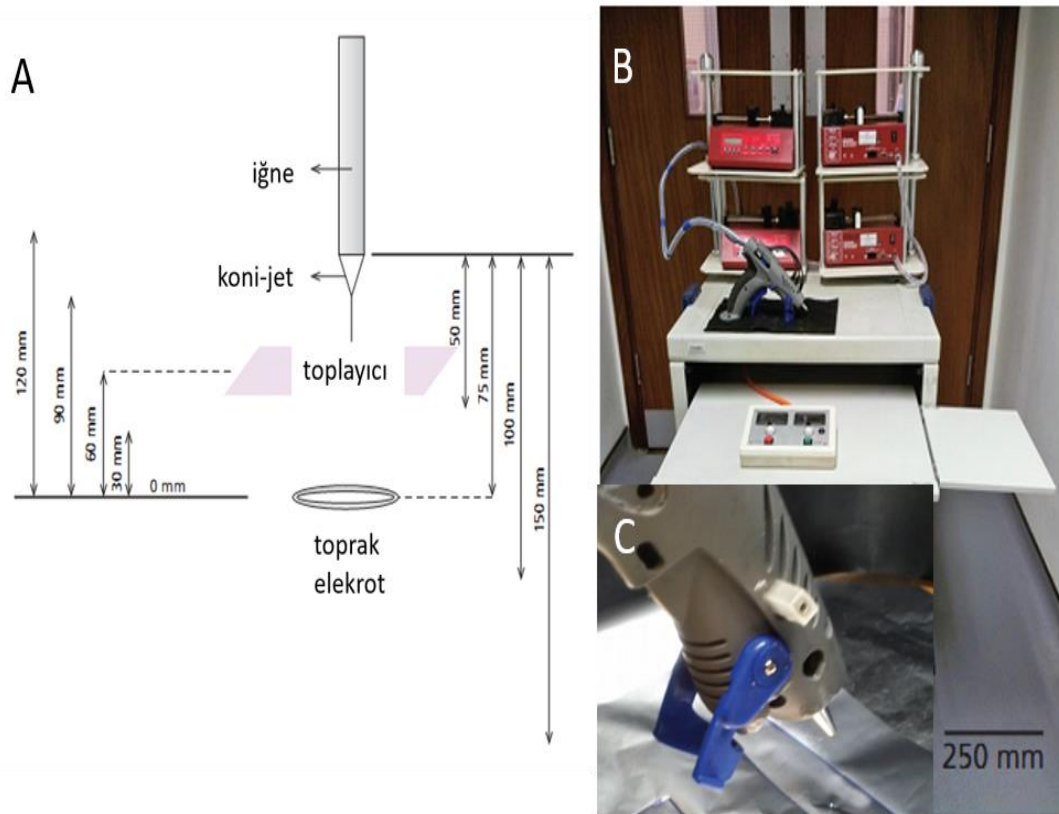
Doku iskelesi üretim teknikleri arasında, mikro/nano ölçekli fiberler yüksek yüzey alan/hacim oranı ve gözenekliliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Mikro/nano fiberlerin bu özellikleri, filtrasyon malzemeleri, sensör uygulamaları, yara örtüleri vb. birçok uygulama alanı bulmaktadır. Özellikle doku mühendisliği iskeleleri olarak ideal malzemelerdir [88-90].

Çizelge 2.5. Doku iskelesi üretim tekniklerinin avantaj ve dezavantajları [91].

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Çözücü buharlaştırma/parçacık uzaklaştırma [92]	Gözeneklilik, gözenek büyüklüğü ve kristalinite kontrolü	Mekanik özelliklerin limitasyonu, çözücü artığı ve porojen özellik ihtiyacı
Porojen uzaklaştırma [93]	Gözeneklilik ve gözenek geometrisi kontrolü	Uygun olmayan gözenek boyutu ve gözeneklerin bağlantılı olmaması
Gaz köpürtme [94]	Organik çözücü gerekmez, gözeneklilik ve gözenek büyüklüğü kontrolü	Mekanik özelliklerin limitasyonu, gözenek bağlantısının uygun olmaması
Kendiliğinden düzenlenme [95, 96]	Gözeneklilik ve gözenek büyüklüğü ve fiber çapı kontrolü	Yüksek malzeme maliyeti, karmaşık tasarım parametreleri
Elektroeğirme [97]	Gözeneklilik ve gözenek büyüklüğü ve fiber çapı kontrolü	Mekanik özelliklerin limitasyonu, fiber çapına bağlı olarak gözenekliliğin azalması
Faz ayrımı [98]	Molekül etkinliğinde azalma olmaması	Morfoloji kontrolünde yaşanan zorluklar
Hızlı prototipleme [99, 100]	Destekleyici malzemeye ihtiyaç duyulmadan mükemmel geometri ve gözeneklilik kontrolü	Yüksek maliyet, kısıtlı polimer türü
Fiber ağ [101]	Hücre tutunması için yüksek yüzey alanı, hızlı besin transferi	Kısıtlı yapısal kararlılık
Fiber bağlanma [102]	Yüksek gözeneklilik ve yüzey-hacim oranı	Zayıf mekanik özellik, limitli polimer uygulaması
Eriyik kalıplama [103]	Gözeneklilik ve gözenek boyutunun bağımsız kontrolü	Amorf olmayan polimerler için yüksek sıcaklık gerektirir
Zar laminasyonu [104]	3 boyutlu makriks eldesi	Düşük mekanik kuvvet, gözenek bağlantısının uygun olmaması
Dondurarak kurutma [91]	Yüksek sıcaklık veya ayrı bir ayırma basamağı gerekmez	Gözeneklilik boyutu, uzun üretim süresi

### 2.3.1. Elektrohırdınamik Eğırme

Fiber yapıların üretimi için kullanılan teknikleri arasında en sık kullanılan yöntem elektrohırdınamik (EHD) eğırmedir. EHD eğırme, biyomalzeme, doku mühendisliği ve farmasötik alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. EHD işleminde sıvıların püskürtülmesi/eğırilmesi; iletken bir sıvının yüzeyine bir elektrik kuvveti uygulamasından kaynaklanmaktadır. Sistem, sıvı halde işlenecek malzeme ile doldurulmuş yüklü bir kılcal ile topraklanmış toplayıcı arasında gerekli elektrik alanını oluşturan yüksek voltajlı bir beslemeden oluşur. Elektrostatik kuvvet, kılcal uçtaki sıvının yüzey gerilimini aştığında, nozül ucundan ince bir jet yayılmaktadır (Şekil 2.5). Bu işlemdede, malzeme oluşturmada gerekli olan kararlı jet, koni-jet olarak da tanımlanmaktadır [105].



Şekil 2.5. A) Elektroeğırme düzeneğinin şematik gösterimi, B) Taşınabilir EHD düzeneğinin görüntüsü, C) Taşınabilir tabanca [106].

Viskozite, yüzey gerilimi, elektrik iletkenliği, elektrik geğergenliği, yoğunluk ve nozüldeki uygulanan voltaj, akış hızı, nozül çapı, nozül ucu ve arasındaki mesafe gibi işleme koşulları, toplayıcı ve besleme ucu ile toprak elektrotu arasındaki

mesafe gibi özellikler optimizasyon parametrelerini oluşturmaktadır. Ayrıca, ortam sıcaklığı, nemi ve ortam basıncı da EHD üretim süreci sırasında dikkate alınmalıdır [107]. Geleneksel EHD'de kurulum, enstrümantasyon ve güvenlik gereksinimleri nedeniyle sabit ve yerleşik bir pozisyonudur. Bununla birlikte, araştırmacılar, taşınabilir ve laboratuvar dışında uygulanabilir bir el tipi cihaz tasarlamayı başarmışlardır. EHD sürecindeki bu son gelişme, yöntemin sınırlarını genişletmiş ve dönüştürülebilir bir teknik haline getirmiştir. Araştırmacılar yeni tasarlanan ve üretilen bu cihazı klinisyenin yara yataklarını kapatmasına yardımcı olabilecek bir alete uyarlamışlardır. Lau ve ark. elektrod ve kollektör mesafesinin, üretilen poli (D, L-laktit-ko-glikolit asit) (PLGA) fiberler üzerine etkisi ve üretilen fiber yapılarının yara örtüsü olarak uygulanabilirliği araştırmıştır [106]. Elde edilen veriler yeni tasarlanan mobil EHD cihazı yardımıyla, mükemmel bir yapıya ile birkaç dakika içinde insan cildinde opak, su geçirmez bir yara örtüsü oluşturabilen mikrometre boyutunda PLGA liflerinin kontrollü bir şekilde biriktirebildiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, elyaf üretme işleminde zorluklar getiren önemli kısıtlamalar da vardır. Bunlar; yüksek voltajlı elektrik alanları ve elektriksel iletkenlik ihtiyacı, liflerin yönlenme sorunları ve düşük üretim verimi nedeniyle ortaya çıkan maliyet ve güvenlik sorunlarıdır [108].

### **2.3.2. Islak Eğirme**

Islak eğirme metodunda eğilmesi istenen polimer çözeltileri doğrudan başka bir çözelti banyosu içine ekstrüzyona tabi tutulur. Sıvı içine eğrilen filament üzerine uygulanan sürüklenme kuvveti doğrudan havaya eğrilen örneklerle göre daha fazla olduğundan eğilme hızı düşüktür. Bu esnada içine eğrilen çözelti, polimerin çözücüsünü çekerek geriye sadece polimerik malzemedan oluşan fiberleri bırakır. Elde edilen elyaf malzemenin çözücüsü tamamen uzaklaştıktan sonra polimerik fiberler çekilip gerilerek istenilen şekil verilebilir ya da çöktürme - koagülasyon banyosu içinden makara sistemleri yardımıyla çekilerek toplanabilir [109, 110].

Islak eğirme tekniği esasta çöktürmeye dayalı bir işlem olup, çözücü olmayan bir çözelti içinde polimer malzemenin çökmesi ya da koagüle olması sonucu malzeme sentezlenir. Genellikle uçucu olmayan çözücülere sahip olduklarından

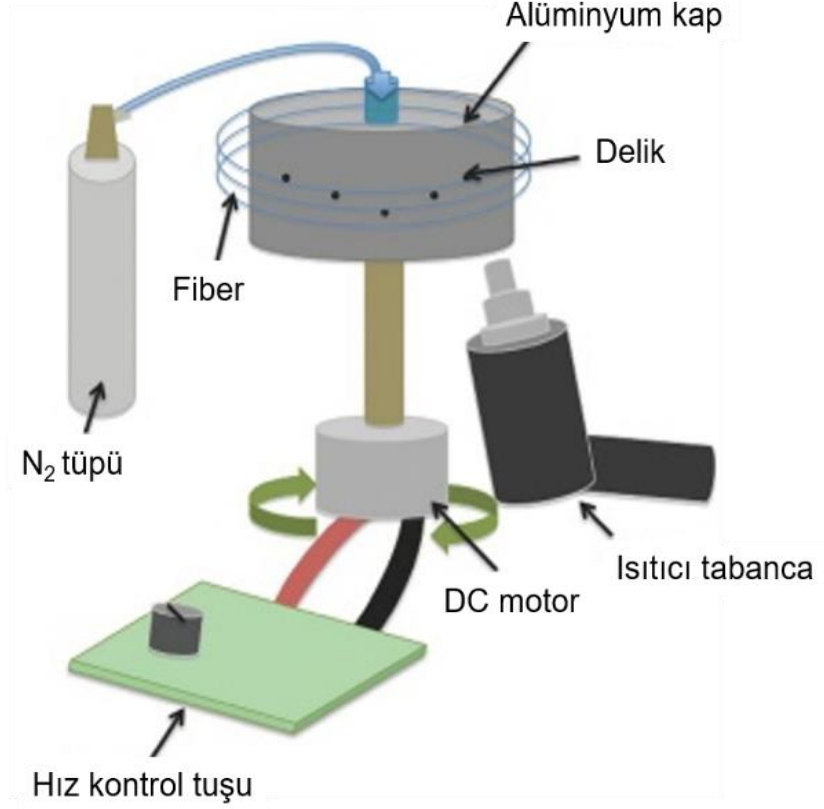
dolayı EHD eğirme için uygun olmayan selülöz türevleri, aljinat ve kitosan başta olmak üzere çoğunlukla polisakkarit temelli yapıların ıslak eğirme tekniği ile gerçekleştirilmiş fiber örnekleri literatürde mevcuttur [111]. Islak eğirme tekniğinde de kullanılacak koagülasyon çözeltilerinin toksisitesi, EHD eğirmeye göre oldukça büyük fiber çapı ve düşük fiber üretim hızları başlıca dezavantaj olarak sayılabilir.

### **2.3.3. Dönel Eğirme Teknikleri**

Konvansiyonel eğirme teknikleri içinde özellikle EHD eğirme nanometre ölçekte ve sürekli bir proseste fiber üretebilmesi açısından başarılı ve en sık kullanılan tekniklerden biridir. Polimer çözeltisinin eğrileceği nozülden fiber oluşumuna geçmesi için yüzey gerilimine karşı koyacak yüksek potansiyel gerilimlere çıkılması gereklidir ve bu da lokal elektrostatik dengesizlikler ve kararsızlıklar sonucu rastgele fiber yönelimleri ve boyut farklılıklarına yol açmaktadır. Eğirme proseslerinde potansiyel fark gerektirmeyen ve merkezkaç kuvvetinin yardımıyla fiber oluşumuna imkan veren nozülsüz fiber üretim teknikleri geliştirilmiş olup elde edilen malzemeler enerji depolamadan doku mühendisliğine kadar değişik uygulamalarda çalışılmıştır [112-114]. Merkezkaç kuvveti ile fiber elde edilen dönel eğirme teknikleri ile EHD eğirmeye göre oldukça fazla verimde fiber üretildiği de rapor edilmiştir [115].

#### **2.3.3.1. Basıncılı Jirasyon**

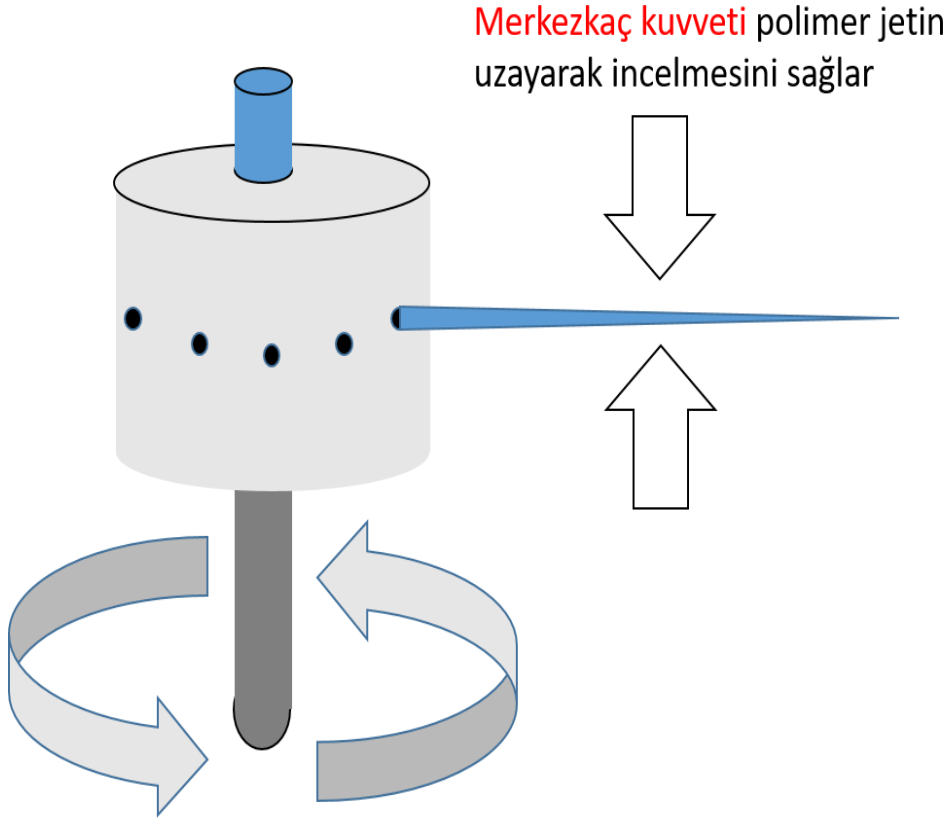
Basıncılı jirasyon, döner küvetin yüzeyinde bulunan deliklerden radyal olarak çoklu çözelti jetleri çıkarmak için yüksek hızlı dönüşü (merkezkaç kuvveti) ve basıncı birlikte kullanan yeni geliştirilmiş bir tekniktir [115]. Silindirik ve alüminyum metalinden yapılmış bir kap kendi eksenini etrafında bir elektrik motoru yardımıyla dönebilmekte ve kabın üstünde bulunan bir giriş yardımı ile gaz girişi sağlanmaktadır. Metal kap üzerinde polimer çözeltinin çıkışına olanak sağlayan mikron ölçekte delikler bulunmaktadır. Tipik bir işlemde kesikli üretim yapılmakta ve önceden hazırlanan polimer çözeltisi kap içine önceden eklenmektedir. Kap döndükçe deliklerden polimer jeti uzaklaşarak fiberleri oluşturmaktadır. Tekniğe ait basit şematik gösterim Şekil 2.6.'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Basıncılı jirasyon tekniğinin şematik gösterimi [116].

Basıncılı jirasyon, Rayleigh-Taylor kararsızlığı prensibini kullanan bir teknik olup, santrifüj eğirme ve çözelti püskürtme yöntemlerinden oluşan hibrid bir yaklaşımdır [117]. Kendi eksenini etrafında dönen bir kabın yüksek hızla dönmesi ile artan dönel hız, yüksek bir merkezkaç kuvvetine yol açar ve polimer çözeltisinin yerdeğıştirmesine sebebiyet verir. Bu kuvvet ile beraber kap içine uygulanan gaz basıncı da polimer çözeltisini yanıl alan boyunca sıralanmış deliklerden dışarı doğru hareket etmeye zorlar. Merkezkaç kuvvetinin de yardımıyla oluşan yüzey gerilimi gradienti sonucu sıvı-hava ara yüzeyinde bir polimer jeti elde edilir. Fiberler, polimer jetinin deliklerden merkezkaç kuvvetinin yardımı ile uzaklaşması ve gazın yarattığı basınç farklılığından dolayı oluşmaya başlar (Şekil 2.7). Polimer çözeltisi uzaklaşmaya başladıkça dereceli olarak buharlaşır ve fiber iplikçikler toplama elemanları üzerinde birikirler.





Şekil 2.7. Basınçlı jirasyon tekniğinde merkezkaç kuvvetinin polimer jeti üzerindeki etkisi.

Mikro-kabarcık, fiber ve kapsül formundaki malzemeler basınçlı jirasyon tekniği ile üretilebilmektedir [118]. Elektroçizme tekniğine karşı basınçlı jirasyon tekniğinin en önemli üstünlüğü, fiber üretimi için elektriksel iletkenlik ve dielektrik sabiti gibi elektriksel özelliklerle ilgili herhangi bir kısıtlamaya sahip olmamasıdır. Dolayısıyla, bu avantaj, elektroçizme yönteminde karşılaşılan, iletken olmayan çözeltilerin kullanımının sınırlandırılmasını ortadan kaldırmaktadır. Basınçlı jirasyon ile üretilen fiber yapılarının çap dağılımı, morfolojideki homojenliği gibi fiziksel özellikleri üretim (dönüş hızı, basınç ve toplama elemanlarının düzeni) parametreleri ile ilişkilidir [119].

Bu parametrelere değinecek olursak ilk olarak döneel hızı inceleyebiliriz. Merkezkaç kuvvetinin büyüklüğü artan döneel hız ile şiddetlendiği için polimer çözeltilisinin daha büyük oranda manipulasyonuna yol açar ve dolayısıyla süreklili olarak uzayan polimer jetinin daha ince fiberler meydana getirmesine sebebiyet verir. Fiber oluşumu için minimum bir döneel hıza ulaşmak gerekmektedir ve bu

minimum değerden aşağıda kalan hızlarda polimerin yüzey gerilimine karşı bir kuvvete ulaşamayacağı için jet oluşumu gözlenemez [117]. Bununla birlikte düşük hızlarda, polimer çözeltisinin kendisi düşük yüzey geriliminden dolayı polimerden ayrılarak kabın duvarlarına yayılabilir.

Fiber oluşumuna etki eden ikinci parameter ise gaz basıncıdır. Optimum bir fiber oluşumu için gaz basıncı gerekli kritik dönel hıza ulaştıktan sonra uygulanmalıdır. Bu değere ulaşılmadan uygulanacak gaz basıncı, yüzey gerilimi daha düşük bileşen olan çözücünün kap duvarındaki deliklerden dışarı buharlaşması ile sonuçlanacaktır. Kritik hıza ulaştıktan sonra uygulanacak gaz basıncı ile fiber morfolosinin kontrolü sağlanabilir. Kap içi ve dışı arasındaki basınç farkı polimer jetine ek bir kuvvet uygulayarak jetin kinetic enerjisini artırır ve daha da fazla uzamasını sağlar. Daha fazla uzayan jet, çapı daha dar olan fiberler oluşturur ve çözücünün daha hızlı buharlaşmasına olanak tanır [120].

Elde edilen fiberlerin morfolojisine etki eden parametrelerde son olarak toplama elemanlarının düzeninden söz edilebilir. Toplama düzeneğinin mesafesi fiber kalınlığına doğrudan etki eder, toplama düzeneğinin artan mesafesi ile incelen polimer jetindeki çözücü buharlaşması artmakta ve fiber çapları küçülmektedir. Yakın toplama mesafesinde ise çözücü buharlaşması tam olarak sağlanamayabilir ve toplama elemanları üzerinde fiberler üzerinde çözücünün topaklanması sonucu boncuk oluşumu gözlenebilir. Boncuklu fiber yapıları da çözelti derişiminin artırılması ile önlenir [121]. Toplama mesafesinin çok yakın olması ise gerekli çözücü buharlaşması tamamlanamayacağından dolayı fiber jetinin toplama elemanları üzerinde birikerek sonlanması ile sonuçlanır ve fiber oluşumu gözlenmez.

Yüksek üretim hızı, üretim kolaylığı ve oldukça kontrollü fiber morfolojisi bu tekniğin dikkat çekici özellikleridir. Poli etilen tereftalat, poli akrilonitril, poli metil metakrilat, poli (etilen oksit), poli (vinil pirolidon) gibi çeşitli sentetik polimerler ile sodyum aljinat, nişasta, karboksimetil sellülöz gibi doğal malzemelerin kullanıldığı yüksek verimde mikro-nano lifler üretilen çalışmalar literatürde yer bulmuştur [115, 119, 122-124]. Çalışmalar arasında doku ilaç salan fiber malzemeler, doku mühendisliği için iskeleler ve diyagnostik uygulamalar için

mikro baloncuk örnekleri bulunmaktadır [125-127]. Basınçlı jirasyon ile üretilen fiberlerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasının nedenleri arasında yüksek derecede yönlendirilmiş olarak üretilmesi ve yüksek yüzey alanı/hacim oranı yatmaktadır. Isı yardımı ile çözücü gerekmeden, doğrudan polimerin eriyik hale getirilmesi ile gerçekleştirilen bir çalışmada, erime sıcaklığı düşük ve biyouyumlu bir polimer olan poli kaprolakton kullanılmış, elde edilen yapılar C2C12 düz kas hücre hattı ile denenmiştir. 95 – 200 °C arasında değişen sıcaklıklarda ve basınç yardımı ile üretilen örneklerde fiber çapının artan sıcaklık ile azaldığı ve boyama deneyleri sonucunda hücrelerin yapılar arasına penetre olabildiği gösterilmiştir [116]. Basınçlı jirasyonun kullanıldığı bir başka çalışmada ise yara örtü malzemesi olarak kullanılması düşünülen bakteriyel sellüloz yapısı poli metil metakrilat ile harmanlanarak jiro-eğrılmıştir. Elde edilen fiberlerin su tutma kapasiteleri yüksek, mikrofibriler ağ yapısına sahip ve hücre uyumlulukları yüksektir [128].

### **2.3.3.2. Eriyik Jirasyon**

Eriyik jirasyon çözücü kullanımına gereksinim olmayan polimerlerden fiber üretiminde kullanılan bir tekniktir. Organik çözücülerin kullanılmaması potansiyel sitotoksik etkilerini ortadan kaldırır [129]. Üretim düzeneği olarak klasik dönel jirasyon ile aynı elemanlara sahiptir; ancak polimerin eriyik hale geçmesini sağlamak amacıyla bir de ısıtma tabancası ya da kaynağı sisteme eklenmiştir [116]. 400°C'ye kadar ısıtılabilen alüminyum jirasyon kabının içindeki eriyik hale geçen polimer, çözelti ile aynı davranışları sergiler ve iğne ucundan dışarı çıkarak fiber oluşumu gerçekleşir.

Yüksek ısıtmalarda erimiş polimer daha uzun süre düşük viskozitede kaldığı için iğne ucundan ayrıldıktan sonra esnemesi daha uzun sürer ve böylelikle çapları daha düşük fiberlerin eldesi mümkündür. Fiberlerin oluşumu çözelti buharlaşmasının yerine jetten ayrıldıktan sonra hızla soğuması ile gerçekleşir.

### **2.3.3.3. Beslemeli Jirasyon**

Beslemeli jirasyon dönel jirasyon tekniğinin bir alt başlığı olup, gaz girişinin yerini çözelti beslemesi almıştır. Bir şırınga pompası tarafından istenilen hızda ortama

eklenen polimer çözültisi yüksek dönüş hızında yüzeydeki deliklerden çıkarak fiber oluşumu gerçekleştirir. Beslemeli jirasyonda fiber çapı ve morfolojisi akış hızı ile kontrol edilmektedir. Sabit ve iyi kontrol edilmiş bir dönüş hızı ile iyi hizalanmış ve düz fiber eldesi mümkündür [130]. Fiber çapı artan akış hızlarında gerçekleşen yüksek kütle transferi ile artış gösterir. Çözücü buharlaşması ve kütle transferinin birbirine yakın olduğu değerlerde homojen ve daha düşük çapa sahip fiberlerin eldesi mümkündür. Fiber üretim hızı da yine artan akış hızına paralel olarak artış göstermektedir.

#### **2.4. Deri Doku Mühendisliği Yaklaşımları**

Kronik yaralar günümüzde küresel bir sağlık sorunu olmakla birlikte beraberinde getirdikleri ağrı, fiziksel rahatsızlık ve psikolojik sıkıntılar gibi olumsuz etkiler ile hastaların yaşam kalitelerini düşürmekte ve dünya çapında yıllık 9.5 milyar dolarlık ekonomik bir maliyete sebep olmaktadır [131-133]. Dünya nüfusunun % 1'inden fazlasının diyabetik ve bası ülseri gibi kronik yaralar yaşadığı bilinmektedir. Örneğin; enfeksiyon, amputasyon (% 15'e kadar) ve mortalite gibi sık görülen komplikasyonlar nedeniyle, diyabetik ayak ülserlerine sahip yaklaşık 600.000 kişi hastanede tedavi görmektedir [134].

Travma veya operasyonlara bağlı akut yaralar, iyileşmenin normal fazlarını takip eder ve 4 haftadan kısa sürede iyileşme belirtileri gösteren yaraları kapsamaktadır. Ancak kronik yaraların iyileşmesi, karmaşık ve iyi anlaşılmamış nedenlere bağlı olarak dört haftadan fazla sürmektedir. Diyabet, ileri yaş, venöz veya arteriyel yetmezlik, böbrek hastalıkları, lokal basınç etkileri, vb. dahil olmak üzere birçok faktör iyileşmede gecikmeye neden olabilmektedir [135]. Kronik yaralar ile genellikle diyabet, obezite ve kanser gibi hastalıklarda daha sık karşılaşmaktadır. Genellikle, nöropati ve yetersiz dolaşıma bağlı olarak, hastalarda diyabetik ayak ülseri oluşabilir, ampütasyona kadar giden ciddi vakalarda da hastanede kalmayı gerektirecek durumlar ile karşılaşılabilir [136]. Küresel olarak, erişkin diyabetik hasta sayısının 2030 yılında 439 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir [133]. Bu tahmin göz önünde bulundurulduğunda Birleşik Krallık ve ABD nüfusunun sırasıyla %6.0 ve %9,3'ünün diyabete sahip olacağı öngörülmektedir [137]. Ayrıca, basınç ve venöz ülserasyonların görülme

sıklığı da yaşlanan nüfusa (AB'nin yaklaşık olarak % 60 nüfusu 2050 yılına kadar 65 yaşını doldurmaktadır) [132] ve obeziteye (2030 yılına kadar dünya nüfusunun % 20'sinin obeziye sahip olacağı tahmin edilmektedir) bağlı olarak artmaktadır [138]. Geleneksel diyabetik ayak ülseri tedavisi, yara bölgesinden ölü dokuların temizlenmesi, çıkarılması (debridman) ve yara örtüsünün uygulanmasını kapsamaktadır. Bazı durumlarda, enfeksiyon nedeniyle antibiyotik tedavisi de uygulanmalıdır. Tedaviyi takiben 3-4 hafta sonra iyileşme olmaması durumunda, mevcut tedavi rejiminin başarılı olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Böyle durumlarda, ileri yara bakımı gerekmekte ve doku mühendisliği ürünleri ile ilgili tedaviler ön plana çıkmaktadır. Benzer şekilde, venöz bacak ülserleri de kronik yaralardır ve sıklıkla kronik venöz yetmezliği veya damarlarda zayıf kan dolaşımı bulunan hastalarda (orta yaşlı ve yaşlı nüfusun yaklaşık% 1'i) görülür. Venöz bacak ülseri için standart olarak kompresyon tedavisi uygulanmaktadır. Yaranın enfekte olması durumunda ise antibiyotik ile tedavi edilmektedir. İyileşme sürecinde hastalar protein, demir, C vitamini veya çinko takviyesi yapılmış diyet uygulamaktadırlar. Kompresyon tedavisi bazı durumlarda etkili olabilmektedir; ancak, uzun zaman alması ve düşük verime sahip olmasından dolayı daha iyi tedavi stratejileri geliştirmek için araştırmalar devam etmektedir. Otolog deri grefti altın standart olmasına rağmen, sınırlı kaynak ve donör bölgesinde bir hasara neden olması en büyük dezavantajlarıdır [135].

Genellikle, geleneksel yara örtüsü uygulamalarında iki katmanlı silikon-kolajen yara örtüleri [139-141], hidrokolloid yara yanık örtüleri [142] vb. geçici yara örtüleri kullanılmaktadır [143-146]. Ancak kronik yaralarda beklenen etkiye sahip değildirler. Diğer yandan, biyolojik yara örtüsü sınıfı olarak allograft, heterograft, amniyotik membran ve sığır ya da diğer kaynaklardan elde edilen kollajen filmler ise viral kontaminasyonların yanı sıra potansiyel olarak hastalık taşıyıcı risklere sahiptirler [147]. Belirtilen bu zorlukların üstesinden gelmek için, fonksiyonel üç boyutlu (3D) deri eşlenikleri üretmek üzere doku mühendisliği yaklaşımları geliştirilmiştir. Günümüzde Apligraf®, Dermagraft®, Transcyte®, Biobrane®, Epicel®, Alloderm® gibi mühendislik ürünleri geliştirilerek deri dokusunu yenilemek/tedavi etmek için kullanılmaktadır [148]. Organogenesis firması tarafından geliştirilen Apligraf®, fibroblast ve keratinosit hücrelerle kültüre edilmiş, sığır kollajen tip I'den oluşan çift katmanlı bir tedavi ürünüdür. Başarılı *in*

*vitro*, *in vivo* alışmalardan sonra klinikte de kullanılmaya başlanmıştır [149-151]. Apligraf® öncelikle ülseratif yaraların tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmış olup, daha sonra yanık yaralarında kullanım için onay almıştır. İşlevsel olarak, mühendislik ürünü olarak üretilen Apligraf® deri eşleniği, ter bezleri ve kıl foliküllerine sahip değildir. Sünnet derisinden izole edilen hücrelerden geliştirildiği için yara iyileşme süresince geçici olarak kullanılmakta olup reddedilme sorunu bulunmamaktadır. Apligraf® uygulamalarında konakçı antikor veya hücre aracılı yanıtı oluştuğuna dair bir rapor bulunmamaktadır. Bir başka doku mühendisliği ürünü olan Dermagraf® ise fibroblast hücreleri, hücre dışı matriks (ECM) ve polimerik taşıyıcıdan (biyolojik olarak parçalanabilir poliglaktin) oluşmaktadır [152, 153]. Bu rn, enfekte olmayan diyabetik ayak ülseri için hazırlanmış ve klinik deneylerde başarılı olmuştur.

Doku mühendisliği olarak geliştirilen deri eşlenikleri iyi bir üzümdür, ancak mevcut ürünler otolog veya allojenik hücrelerle sınırlıdır. Deri eşleniklerinin geliştirilmesi için kullanılan hücreler, hastaların otolog hücrelerinden veya yenidoğan n-ciltlerinden allojenik uygulamalar ile sağlanmaktadır [154]. Örneğin, ileri yaşlardaki hastaların otolog hücreleri düşük proliferasyon kapasitesine sahiptir. Ayrıca, deri eşleniklerinin gelişmesi için gereken 3 haftadan fazla sevkiyat süresi, bu ürünlerin acil durumlarda kullanılmasını sınırlayıcı faktörlerdir. Doku mühendisliği uygulamalarında diğer bir önemli faktör, dermal bir matriks gibi hücre çoğalmasını ve yenilenmesini destekleyen doku iskelesidir. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, hayvan kaynaklı substrat ve faktörlere bağlılığı ortadan kaldıracak, tekrarlanabilirliği yüksek olan ve rutin olarak üretilebilecek, güvenli, biyotakliti, biyoaktif malzemelere olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Bu kapsamda biyoyumlu ve biyobozunur polimer yapılarının sentezlenmesi ile istenilen özelliklere sahip doku iskeleleri, hidrojeller, polimerik ilaç taşıyıcı sistemler ve ara yüzeylerin eldesi ile mümkündür. Hücreler bu tip biyomalzemelerle etkileştikten sonra membran proteinleri ile etkileşime girerek hücre adhezhezyonunun sağlanması, taşıyıcı sistemlerin hücre içerisine alınması v.b. mümkün olabilmektedir. Doku mühendisliğine yönelik uygulamalarda ekstrasellüler matriks (ECM) retimini indükleyen ve/veya taklit eden, fiziksel-kimyasal uyarılara karşı cevap verebilen biyomalzeme çalışmaları gün gittikçe önem kazanmaktadır. 3 Boyutlu dokuyu

taklit edebilmek için kullanılan doku iskelesi ile hücrelerin buldukları çevredeki dokuyla benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olması önemlidir. Bu çalışmada fiber destekli hibrid hidrojel yapıdaki doku iskeleleri geliştirilerek deri doku mühendisliğine yönelik potansiyelleri araştırılmıştır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar

Kimyasal	Marka
Sebasik asit, 99%	Sigma-Aldrich (Almanya)
1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-propanol, ≥99% (HFIP)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Gliserol bioXtra, ≥99% (GC)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Xylitol ≥99%	Sigma-Aldrich (Almanya)
Metakrilik anhidrit	Sigma-Aldrich (Almanya)
2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiofenon 98% (Irgacure 2959)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Poli(etilen glikol) Mw 550	Sigma-Aldrich (Almanya)
Poli(etilen glikol) Mw 1500	AppliChem (Almanya)
Poli(etilen glikol) Mw 2000	Sigma-Aldrich (Almanya)
Poli(etilen glikol) Mw 4000	Merck (Almanya)
Poli(etilen glikol) Mw 6000	Sigma-Aldrich (Almanya)
Poli(vinil alkol)(PVA) Mw 30,000-70,000 87-90% hidrolize	Sigma-Aldrich (Almanya)
Poli(vinil alkol)(PVA) Mw 89,000-98,000 99+% hidrolize	Sigma-Aldrich (Almanya)
Poli(vinil alkol)(PVA) Mw 146,000-186,000 87-89% hidrolize	Sigma-Aldrich (Almanya)
Etanol, 95%	Sigma-Aldrich (Almanya)
Fosfat tampon tableti	Sigma-Aldrich (Almanya)
Hidroklorik asit, 37%	Sigma-Aldrich (Almanya)



İzopropanol, ≥99%	Sigma-Aldrich (Almanya)
Jelatin	Sigma-Aldrich (Almanya)
Selüloz diyaliz membranı	Sigma-Aldrich (Almanya)
Gluteraldehit	Sigma-Aldrich (Almanya)
Hekzametil disilazan ≥99%	Sigma-Aldrich (Almanya)
Dimetil sülfoksit	Sigma-Aldrich (Almanya)
Tripsin/Edta	Biochrom (Almanya)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom (Almanya)
Fibroblast hücre hattı - L929 (Fare)	ATCC (ABD)
Keratinosit hücre hattı - HaCaT (İnsan)	ATCC (ABD)
Fibroblast hücre hattı - HDFa (İnsan)	ATCC (ABD)
FBS (Fetal Sığır Serumı)	Biochrom (Almanya)
L-glutamin	Biochrom (Almanya)
Penicilin/streptomycin çözeltisi	Biochrom (Almanya)
MTT (4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit)	Biochrom (Almanya)
Steril fosfat tamponu	Biochrom (Almanya)
Floresan Hücre İşaretleyici (CellTracker) Yeşil CMFDA (5-klorometilfloresans diasetat)	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Floresan Hücre İşaretleyici (CellTracker) Kırmızı CMTPX	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Canlı/Ölü Canlılık/Sitotoksisite Kiti	Thermo Fisher Scientific (ABD)

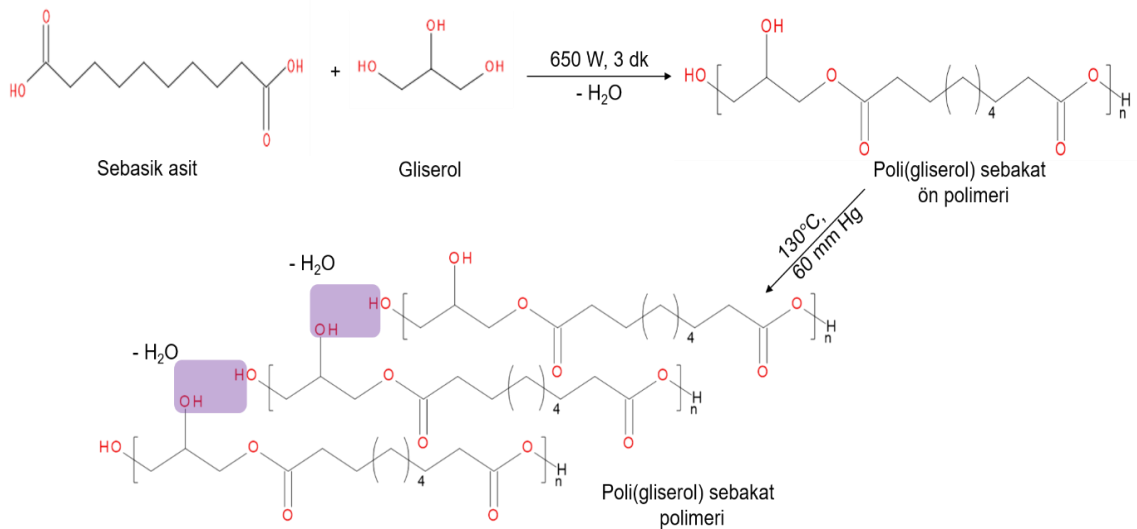
## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Poli(poliol) Sebakat Polimerlerinin Sentezi

Poli(poliol)sebakat sentezi poliöl ve sebasik asitin kondenzasyon polimerizasyon reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Poliöl grubu olarak gliserol kullanılarak poli(gliserol) sebakat (PGS), ksilitol kullanılarak ise poli(ksilitol) sebakat (PXS) polimerleri sentezlenmiştir. Ayrıca sentezlenen PGS ve PXS yapılarına ön polimer sentezi basamağında polietilen glikol eklenmesi ile amfifilik poli(gliserol sebakat)-*ko*-poli(etilen glikol) (PGS-*ko*-PEG) ve poli(ksilitol sebakat)-*ko*-poli(etilen glikol) (PXS-*ko*-PEG) kopolimerleri sentezlenmiştir. Sentezle ilgili yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

#### 3.2.1.1. Poli(gliserol) Sebakat (PGS) Polimerinin Sentezi

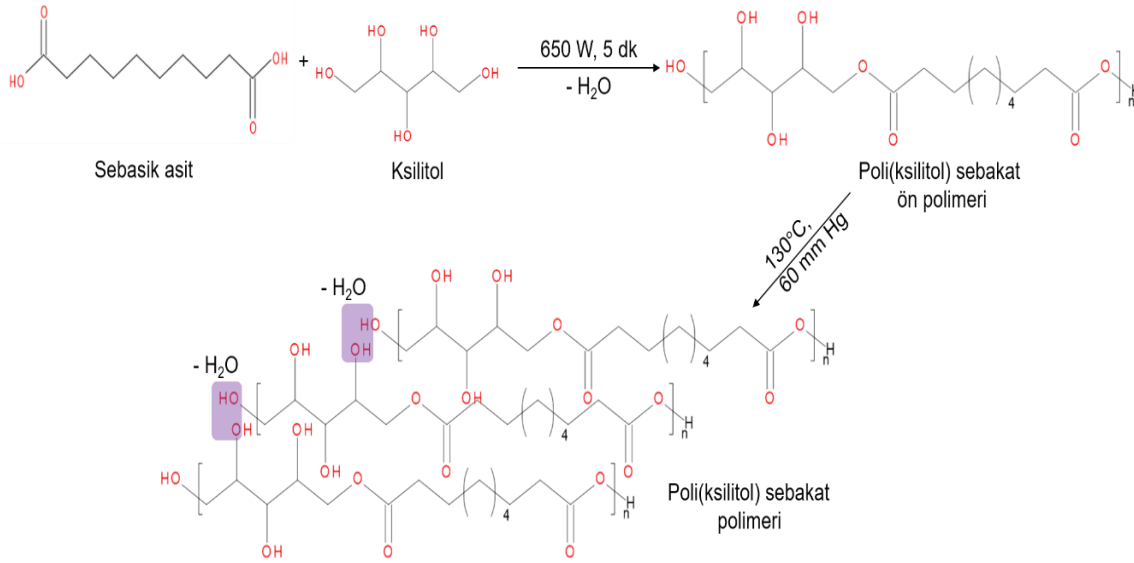
Poli(gliserol)sebakat sentezi için 1:1 molar oranda gliserol ve sebasik asit karışımının mikrodalga fırın ile 650 W güçte, 3 dk reaksiyona sokulmasıyla ön polimer elde edilmiştir [155]. Daha sonra elde edilen ön polimer 130 °C'de 60 mm Hg basınç altında kürlenerek kondenzasyon polimerizasyonu tamamlanmıştır [5, 156]. Farklı reaksiyon süreleri denenerek kürlenme süresi optimize edilmiştir. Optimizasyon için, elde edilen PGS ön polimeri vakum etüvünde 130 °C'de 6, 12, 24, 48 ve 72 sa çapraz bağlanarak ön polimerden elastomer sentezi sağlanmış olup, termal çapraz bağlanma süresi optimize edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Poli(gliserol) sebakat (PGS) sentezi.

### 3.2.1.2. Poli(ksilitol)Sebakat (PXS) Polimerinin Sentezi

PXS sentezi için, 1:1 molar oranda ksilitol ve sebasik asit mikrodalga fırında 650 W güç ve 5 dk reaksiyona sokulmuştur [155, 157]. Bu reaksiyon sonucunda PXS ön polimeri elde edilmiştir. Elde edilen PXS ön polimeri vakum etüvünde 130 °C'de 6, 12, 24, 48 ve 72 sa çapraz bağlanarak ön polimerden elastomer sentezi sağlanmış olup, termal çapraz bağlanma süresi optimize edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Poli(ksilitol) sebakat (PXS) sentezi.

### 3.2.2. Poli(poliol sebakat)-ko-poli(etilen glikol) (PPS-ko-PEG) Polimerinin Sentezi

Poli(poliol sebakat)-ko-poli(etilen glikol) (PPS-ko-PEG) ön polimer sentezi geleneksel yöntemde iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamakta sebasik asit ve polietilen glikol farklı molar oranlarda karıştırılarak 120 °C'de, 3 sa azot atmosferinde reaksiyon gerçekleştirilmektedir. 3 sa sonunda basınç 5 Torr'a düşürülerek reaksiyon 24 sa daha devam ettirilmektedir. Daha sonra azot ortamında gliserol/ksilitol eklenerek 120 °C'de, 48 sa reaksiyon devam ettirilmektedir. Tetrahidrofuran (THF) ile çöktürülen ön polimer yapısı oda sıcaklığında kurumaya bırakılmaktadır. Tez kapsamında, PGS mikrodalga polimerizasyon yönteminden faydalanılarak, geleneksel PGS-ko-PEG sentez

yöntemi modifiye edilerek ön polimer sentezi iki basamakta mikrodalga fırın ile gerçekleştirilmiştir.

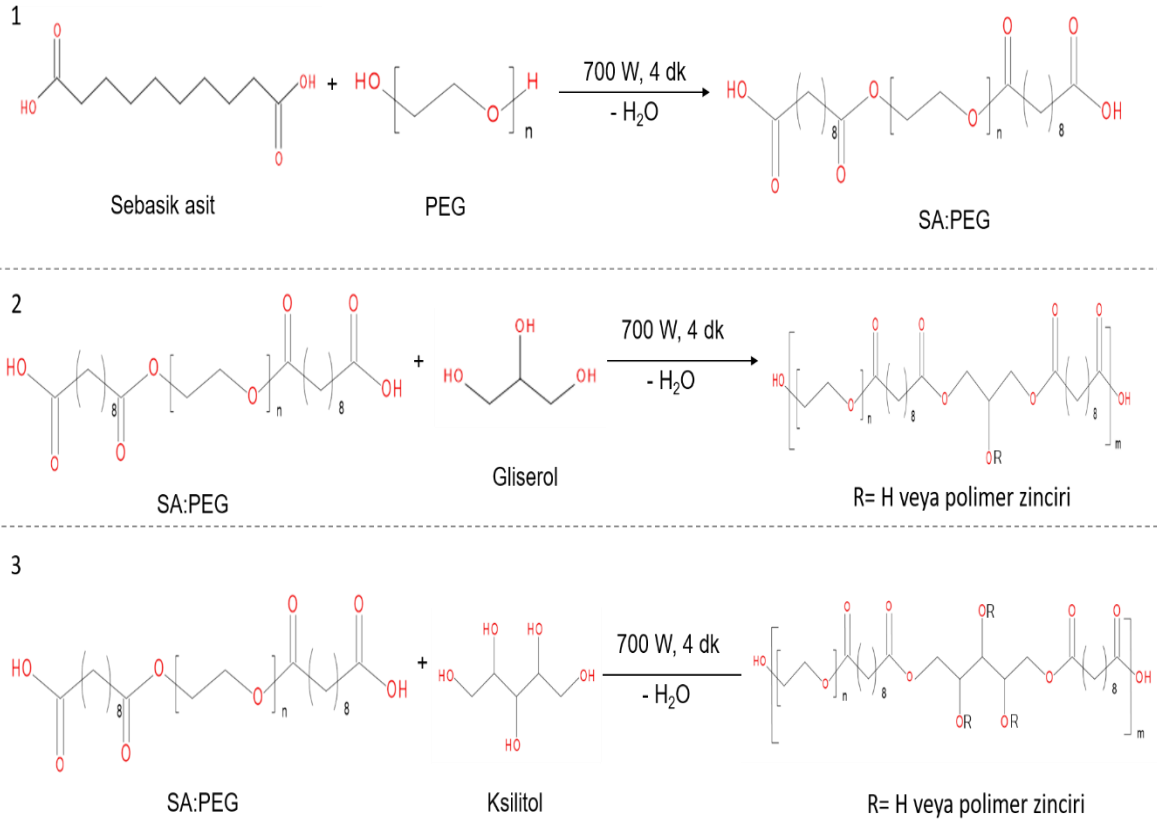
### **3.2.2.1. Poli(glisero1 sebakat)-ko-poli(etilen glikol) (PGS-ko-PEG)**

PGS mikrodalga polimerizasyon yönteminden esinlenilerek, geleneksel PGS-ko-PEG sentez yöntemi [158] modifiye edilmiş olup mikrodalga polimerizasyonu ile farklı moleköl ağırlıklarında PEG (MA: 550, 1500, 2000, 4000, 6000 g/mol) kullanılarak, farklı molar oranlarda polietilen glikol:sebasik asit karışımının mikrodalga fırın ile 700 W güçte, 4 dk süresince reaksiyon gerçekleştirilerek ön polimer yapıları elde edilmiştir. Elde edilen ön polimer 700 W güçte, 4 dk gliserol ile reaksiyona sokularak PGS-ko-PEG ön polimer reaksiyonu tamamlanmıştır. Daha sonra elde edilen ön polimer yapıları 130 °C'de 60 mm Hg basınç altında kürlenmiş ve kürlenme süresi optimize edilmiştir (Şekil 3.3).

### **3.2.2.2. Poli(ksilitol sebakat)-ko-poli(etilen glikol) (PXS-ko-PEG)**

Mikrodalga polimerizasyonu için modifiye edilen PGS-ko-PEG sentez yöntemi ile aynı şekilde modifiye edilen PXS-ko-PEG sentezi de farklı moleköl ağırlıklarında PEG (MA: 550, 1500, 2000, 4000, 6000 g/mol) kullanılarak, farklı molar oranlarda polietilen glikol:sebasik asit karışımının mikrodalga fırın ile 700 W güçte, 4 dk süresince reaksiyon gerçekleştirilmesiyle ön polimer yapıları elde edilmiştir. Daha sonra ön polimere ksilitol eklenerek 700 W güçte, 4 dk mikrodalga polimerizasyon reaksiyonu ile PXS-ko-PEG ön polimeri elde edilmiştir [159]. Elde edilen ön polimer yapıları 130 °C'de 60 mm Hg basınç altında kürlenmiş ve kürlenme süresi optimize edilmiştir.

Poli(poliol) sebakat polimerlerinin sentezinde kullanılan mol oranları Çizelge 3.1.'de detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 3.3. PPS-ko-PEG ön polimerlerinin sentezi. 1) Sebasik asit – polietilen glikol ön polimer sentezi, 2) PGS-ko-PEG ve 3) PXS-ko-PEG ön polimerlerinin sentezi.

Çizelge 3.1. Poli(poliol) sebakat (PPS) bazlı polimerlerin sentezinde kullanılan PEG, sebasit asit ve poliölün mol oranları.

Polimer	Mol oranı				
	PEG		Sebasik asit	Poliol	
	Mw	mol		Gliserol	Ksilitol
<b>PGS</b>	-	-	1	1	-
<b>PGS-PEG<sub>1</sub></b>	2000	0.125	1	1	-
<b>PGS-PEG<sub>2</sub></b>	2000	0.250	1	1	-
<b>PGS-PEG<sub>3</sub></b>	2000	0.500	1	1	-
<b>PGS-PEG<sub>4</sub></b>	550	0.125	1	1	-
<b>PGS-PEG<sub>5</sub></b>	1500	0.125	1	1	-
<b>PGS-PEG<sub>6</sub></b>	4000	0.125	1	1	-
<b>PGS-PEG<sub>7</sub></b>	6000	0.125	1	1	-
<b>PXS</b>	-	-	1	-	1
<b>PXS-PEG<sub>1</sub></b>	2000	0.125	1	-	1
<b>PXS-PEG<sub>2</sub></b>	2000	0.250	1	-	1
<b>PXS-PEG<sub>3</sub></b>	2000	0.500	1	-	1
<b>PXS-PEG<sub>4</sub></b>	550	0.125	1	-	1
<b>PXS-PEG<sub>5</sub></b>	1500	0.125	1	-	1
<b>PXS-PEG<sub>6</sub></b>	4000	0.125	1	-	1
<b>PXS-PEG<sub>7</sub></b>	6000	0.125	1	-	1

### 3.3. Fiber Üretimi

#### 3.3.1. Taşınabilir Elektro Hidrodinamik Sistem ile Poli(poliol) Sebakat Elektro-Eğrilmiş Fiber Üretimi

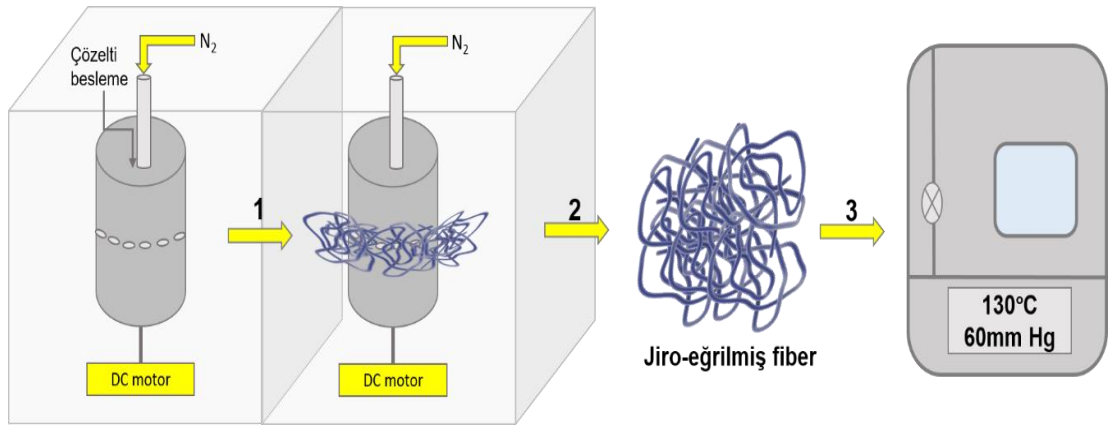
PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerinin ön polimeri (pPPS) ve PVA, HFIP içerisinde çözülmüştür. pPGS:PVA 55:45 (w/w) oranında ve %15 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanarak 12 sa oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Hazırlanan polimer çözeltileri EHD sisteminde şırınga pompası (Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, Birleşik Krallık) besleme ünitesine yerleştirilmiştir. Taşınabilir tabanca sisteminde 18 G ekstrüzyon iğnesi (Stainless tube & Needle Co. Ltd, Staffordshire, UK) kullanılmıştır. Akış hızı 24 µL/dk ve 48 µL/dk olarak kullanılmıştır. Taşınabilir sistemdeki besleme ünitesinin toplayıcı ile arasındaki mesafe 13 cm olarak belirlenmiş ve oda koşullarında (% 44.7 ±4 nem ve 22 ± 3 ° C sıcaklıkta) fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Elektro-eğrilmiş fiberler 130 ° C'de ve 60 mm Hg basınç altında termal olarak çapraz bağlanmıştır. Yapıdaki PVA'nın uzaklaştırılması için elektro-eğrilmiş fiberler, 24 sa deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra çapraz bağlanmamış ön polimer kalıntılarını uzaklaştırmak için seri etanol çözeltileri (% 25, % 50, % 75 ve % 100 etanol:deiyonize su karışımları (v/v)) kullanılmıştır.

#### 3.3.2. Basıncı Jirasyon Tekniği ile Poli(poliol) Sebakat Jiro-Eğrilmiş Fiber Üretimi

Basıncı döndürme tekniği şematik olarak Şekil 3.4.'de gösterilmektedir. Deney düzeneği bir güvenlik kabininde döner silindirik alüminyum kap, gaz girişi, döner motor, hız ve gaz kontrolörleri içermektedir. Alüminyum kap, ~ 60 mm çapında x 35 mm yüksekliğinde boyutlara ve 0.25 mm yarıçapında merkez çizgide 24 deliğe sahiptir. Elde edilen PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerleri basıncı jirasyon tekniği ile jiro-eğrilmiş 3 boyutlu fiber yapılarında üretilmiştir.

PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerinin ön polimeri (pPPS) PVA ile karışım oluşturacak şekilde HFIP içerisinde çözülmüştür. Öncelikle, pPGS:PVA 55:45 (w/w) oranında ve üç farklı molekül ağırlığında PVA kullanılarak (Mw: 30,000-70,000) 12 sa oda sıcaklığında karıştırılmıştır.

pPGS:PVA çözeltileri farklı konsantrasyonlarda (% 15, % 10 ve % 5 (w/v)) hazırlanarak jirasyon tekniğinin sistem parametreleri optimize edilmiş (basınç, dönüş hızı) ve diğer polimerler (PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG) ile optimize koşullarda üretim gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 5 mL polimer çözeltisi kaba yerleştirilmiş ve jiro-eğrilmiş fiber yapıları, oda koşullarında (% 45±5 nem ve 24±2 °C sıcaklıkta) ayrı ayrı 36.000 rpm ve 0.1 MPa basınç (N<sub>2</sub> atm) dönüş hızında üretilmiştir. Jiro-eğrilmiş fiber üretiminden sonra, pPPS:PVA fiber yapıları, 130 °C'de ve 60 mmHg basıncında termal olarak çapraz bağlanmıştır. Daha sonra, jiro-eğrilmiş fiberlerden, PVA'nın uzaklaştırılması için 24 sa deiyonize su yıkanmıştır. Çapraz bağlanmamış ön polimer kalıntılarını uzaklaştırmak için ise seri etanol çözeltileri (% 25, % 50, % 75 ve % 100 etanol:deiyonize su karışımları (v/v)) ile yıkanmıştır.



Şekil 3.4. Jiro-eğrilmiş fiber üretimin basamaklarının şematik gösterimi. Jiro-eğrilmiş fiberlerin 1) üretimi, 2) toplanması, 3) çapraz bağlanması.

### 3.4. Gelatin Metakrilat (Gel-M) Sentezi

Gel-M sentezi için % 10'luk (w/v) gelatin:fosfat tamponu çözeltisi 50 °C'de hazırlanarak 1 sa reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çözeltiliye 0.8 mL/g oranında metakrilik anhidrit çözeltisi eklenmiştir. 50 °C'de gerçekleştirilen 2.5 sa reaksiyonun sonunda çözelti diyaliz membranlarına yerleştirilerek 3 hafta süre ile diyaliz edilerek reaksiyona girmeyen metakrilik anhidritlerin yapısından uzaklaşması sağlanmıştır. Diyaliz süresinin sonunda membranlardaki çözelti 1:1 oranda PBS ile seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti dondurularak kurutulmuş ve



Gel-M sentezi tamamlanmıştır [46, 160]. Sentezlenen jelatin metakrilatın akrilatlanma derecesi (MD) jelatinin yapısında bulunan lizin kaynaklı amino gruplarının, jelatin metakrilat sentezlenmesi sonrasındaki NMR spektrumlarındaki integrasyon alanlarının değişimi üzerinden hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1) [161].

$$\% \text{ MD} = \left( 1 - \frac{\text{İntegrasyon Alanı (lizin metilen Gel-M)}}{\text{İntegrasyon Alanı (lizin metilen jelatin)}} \right) \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

### **3.5. Sentezlenen Polimer Yapıların Karakterizasyonu**

#### **3.5.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)**

FTIR Spektrofotometresi (Thermo Nicolet IS-50) (Almanya) cihazının ATR ataçmanı yardımıyla polimer yapılarının kimyasal karakterizasyonu spektrum analizi ile 600-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalgaboyunda, 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlük ve 32 tarama sayısında gerçekleştirilmiştir.

#### **3.5.2. $^1\text{H-NMR}$ Analizi**

Sentezlenen polimerin yapı analizi  $^1\text{H-NMR}$  analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analizler Spektrum 400 MHz Bruker NMR (Almanya) spektrometresi ile 25°C'de kaydedilmiştir.

#### **3.5.3. Termal Gravimetrik Analiz (TGA)**

Sentezlenen polimer yapılarının termal kararlılıkları TA Instruments Q600-SDT (A.B.D) cihazı ile 600 °C'ye kadar ısıtılarak değerlendirilmiştir. Sentezlenen polimer yapılarının ön polimer ve çapraz bağlanmış yapıları kütle kaybı açısından karşılaştırmalı olarak TGA sonuçları üzerinden incelenmiştir.

#### **3.5.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi**

Sentezlenen polimer yapılarının camsı geçiş sıcaklıkları ve enerji kapasiteleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (Perkin Elmer Diamond DSC) (A.B.D) cihazı

ile 10 °C/dk ısıtma hızında -60 °C/ 300 °C sıcaklık aralığında N<sub>2</sub> atmosferinde gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.5. Mekanik Test

Sentezlenen polimerlerin mekanik özellikleri mekanik test cihazında (Zwick/Roell Z250, Almanya) ~% 47 nem dengesi ve 24 °C sıcaklıkta koşullandırılmış ortamda gerçekleştirilmiştir. Çekme hızı 10 mm/dk ve çekme kuvveti 100N olarak sabit tutulmuştur. Gerilim-gerinim eğrisinin eğiminden yararlanılarak Young's modülüs değeri hesaplanmıştır (n=3).

### 3.5.6. Çözeltilerin Viskozite ve Yüzey Gerilimi Değerlerinin Belirlenmesi

Fiber üretiminde kullanılan çözeltilerin viskozite değerleri, SCV-18 miline sahip bir Brookfield DV-III Ultra Viskozimetre (Brookfield Viscometers Ltd, Harlow, Birleşik Krallık) ile ölçülmüştür. Ayrıca, yüzey gerilimi değerleri, Standart Wilhelmy plaka yöntemi kullanılarak bir Krüss dijital tansiyometre K9 (KRÜSS GmbH - Birleşik Krallık) ile belirlenmiştir. EHD sisteminde kullanılan çözeltilerin iletkenlik değerleri, iletkenlik ölçer (Jenway 3450, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Birleşik Krallık) ile belirlenmiştir (n=3).

### 3.5.7. Hidrojellerin Su Tutma Kapasitelerinin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda (% 5, % 7.5 ve % 10 (w/v)) hazırlanmış hidrojellerin su tutma kapasitelerinin değerlendirilmesi için eşit yüzey alanında (r= 0.8 cm) daire şeklinde hazırlanarak tartılmıştır (W<sub>0</sub>). Örnekler 2 mL PBS çözeltisi içerisinde 24 sa bekletildikten sonra çözelti içerisinde alınarak, tekrar tartılmış (W<sub>1</sub>) ve yüzde su tutma kapasitesi aşağı verilen eşitlikle hesaplanmıştır (Eşitlik 3.2) (n=3).

$$\% \text{ su tutma kapasitesi} = \frac{W_1 - W_0}{W_1} \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

### 3.5.8. Hidrolitik Bozunma Profillerinin Belirlenmesi

Elastomer ve hidrojel yapılarının hidrolitik bozunmalarının incelenerek, zamana karşı kütle kaybı miktarlarının belirlenmesi için kürlenmiş polimerler eşit yüzey alanına sahip daire şeklinde hazırlanarak tartılmıştır ( $W_0$ ). 2 mL fosfat tampon çözeltisi içerisinde 37 °C'de sıcak su banyosunda tutulan örnekler belirli zaman aralıklarında kurutulmuş ve tekrar tartılarak ( $W_1$ ) hidrolitik bozunma dereceleri ağırlıklı olarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.3) (n=6).

$$\% \text{ kütle kaybı} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

### 3.5.9. Hidrojel Yapıların Viskoelastik Özelliklerinin Belirlenmesi

Gel-M hidrojel örnekleri % 5, % 7.5 ve % 10 (w/v) konsantrasyonlarda hazırlanmış ve konsantrasyona bağlı olarak viskoelastik özellikleri incelenmiştir. Hidrojel gruplarının viskoelastik karakterizasyonu Kinexus Pro+ Rheometer (Malvern, Birleşik Krallık) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Yapıların genel viskoelastik davranışını belirlemek için %1 gerinimde 0.1-10 Hz frekans aralığında frekans tarama testleri gerçekleştirilmiştir. Hidrojellerin dayanabileceği gerinimi belirlemek ve jel olarak kullanılabilirliğinin incelenmesi için gerinim taramaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hidrojel örnekleri 37°C'de 1 sa kararlı hale getirildikten sonra % 0.1 – 1000 gerinim aralığı ve %1 sabit frekans değerlerinde paralel plaka geometrisinde analiz edilmiş ve hidrojel bileşenlerinin viskoelastik özellikleri incelenmiştir (n=3).

### 3.5.10. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu

Elektron mikroskobu ile görüntülenen fiber ve hidrojel yapıları analiz öncesinde altın/paladyum karışımı Quorum Q1500R ES (Quorum Technologies Ltd., Birleşik Krallık) ile kaplanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarının ardından gerçekleştirilen SEM analizleri öncesinde fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Fiksasyon işleminde öncelikle malzemeler PBS ile yıkanmış ve 30 dk glutaraldehit (% 2.5 (v/v)) çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra 15 dk seri alkol

yıkamaları yapılarak (sırasıyla % 25, % 50, % 70, % 90, % 95 ve % 100 (v/v)) malzeme ve hücrelerin su içerikleri yapıdan uzaklaştırılmıştır. Son basamakta, hekzametil disilazan ( $\geq 99\%$ ) damlatılarak örnekler kurumaya bırakılmıştır. SEM analizleri Hitachi (Japonya) ve TESCAN Gaia3 (Çek Cumhuriyeti) cihazları ile 5 kV hızlandırma geriliminde gerçekleştirilmiştir.

### **3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları**

#### **3.6.1. İndirekt Sitotoksosite Çalışmaları**

Sentezlenen polimer yapılarının canlı hücreler üzerinde sitotoksik etkisi ISO10993-5 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi–Bölüm 5: *in vitro* sitotoksite testleri ” standartının “Endirekt MTT sitotoksite testi” yöntemine uygun olarak gerçekleştirilmiştir ve hücre hattı olarak L929 fare fibroblast hücreleri (ATCC NCTC clone 929:CCL 1) kullanılmıştır. Testlerde kullanılan besi yeri; % 90 DMEM (Dulbecco'nun Minimum Esansiyel Ortamı), %10 FBS (Fetal Sığır Serumu), 4 mM L-glutamin, 100 IU/mL penicilin/streptomycin çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış ve kullanımdan önce 37°C'deki su banyosunda ısıtılmış geri kalan zamanlarda ise 4°C'de saklanmıştır. MTT ((4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) çözeltisi steril PBS içinde 5 µg/mL konsantrasyonda çözülerek hazırlanmıştır. Test edilen polimer numuneleri yukarıdaki bileşime sahip kültür ortamlarında 6 cm<sup>2</sup>/mL orana denk gelecek şekilde 3 gün boyunca 37°C'de ayrı test tüplerinde inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak da örnek malzemesi içermeyen besi yeri de aynı koşullarda bekletilmiştir (negatif kontrol). 75 cm<sup>2</sup> hücre kültür kaplarında çoğaltılan L929 hücreleri kültür kabının tabanını kapladıklarında tripsin/EDTA çözeltisi kullanılarak enzimatik olarak yüzeyden kaldırılmış, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst faz uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelletinden besi ortamı kullanılarak 1x10<sup>5</sup> hücre/mL derişimde hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücre süspansiyonundan 100 µL'lik kısımlar 96 kuyucuklu plakalara her bir örnek grubu ve negatif kontrol için ekim yapılmıştır (n=6). İnkübasyon koşulları 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve >%90 nem oranı olarak sabit tutulmuştur. 24 sa inkübe olan hücreler ertesi gün besi yerlerinden arındırılmış ve bu kez kuyucuklara 3 gün malzemeler ile inkübe edilmiş ilgili örnek gruplarından 100 µL'lik besi yerleri eklenmiş ve 24 sa daha inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücre

ortamları kuyucuklardan alınmış ve bu kez MTT boyası içeren kültür ortamı (hacimce 10:90, MTT çözeltisi:besi yeri) eklenmiştir. MTT boyası içeren besiyerinde hücreler 3.5 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmış ve canlı hücreler tarafından MTT'nin metabolize edilmesiyle oluşan mor renkli formazan kristalleri 0.04M HCl içeren izopropanol çözeltisinin (100 µL) eklenmesiyle çözülmüştür. Karanlık ortamda oda koşullarında 30 dk inkübe edilen kuyucuklardan alınan 50 µL'lik hacimler yeni bir 96 kuyucuklu kaba aktarılarak ELISA plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Aynı yöntem Gel-M hidrojel yapıları için de uygulanmıştır. Ancak Gel-M yapıları doku iskelesi uygulamalarında keratinosit hücreleri ile birlikte kullanılacağından hücre hattı olarak ATCC HaCaT hücre hattı kullanılmıştır. Gel-M, DMEM besiyerinde çözülerek steril koşullarda hazırlanmıştır. Gel-M hidrojel yapılarının % 10, % 7.5 ve % 5 (w/v) Gel-M çözeltileri hazırlanmış ve UV çapraz bağlama yöntemi ile hidrojeller hazırlanmıştır. Hazırlanan hidrojeller yukarıdaki yöntem uygulanarak besiyeri içerisinde 3 gün süre ile bekletilmiş ve indirekt MTT protokolü uygulanmıştır.

### **3.6.2. Direkt Hücre Canlılığı Çalışmaları**

İndirekt sitotoksikite kültürü çalışmalarında biyouyumlu olduğu belirlenen polimer yapıları ile hazırlanan EHD ile üretilen elektro-eğrilmiş fiber yapılarının hücre-malzeme etkileşimlerinin belirlenmesi için fiber yapılarına doğrudan hücre canlılığı testi uygulanmıştır. Hazırlanan örnekler steril edildikten sonra 48 kuyucuklu hücre kültür kaplarına yerleştirilmiştir. Herbir örnek kuyucuğuna  $1 \times 10^5$  hücre/mL derişimdeki hücre süspansiyonundan 100 µL hücre çözeltisi ekilmiştir. Kontrol grubu olarak örnek içermeyen kuyucuklara da eşit sayıda hücre ekilmiştir (n= 3). 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve >%90 nem koşullarında inkübasyon yapılmıştır. 48 saatte bir besiyeri değiştirilmiştir. Kültür ortamında kullanılan besiyeri; % 90 DMEM (Dulbecco'nun Minimum Esansiyel Ortamı), %10 FBS (Fetal Sığır Serumu), 4 mM L-glutamin, 100 IU/mL penicilin/streptomycin çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış ve kullanımlardan önce 37°C'deki su banyosunda ısıtılmış, geri kalan zamanlarda ise 4°C'de saklanmıştır. Örnek gruplarından 1, 4 ve 7. günlerin sonunda üzerindeki besiyeri çözeltisi uzaklaştırılmış ve hazırlanan MTT

çözeltisi hacimce 10:90, MTT çözeltisi:besi yeri derişiminde hazırlanarak kuyucuklara 100 µL eklenmiştir. Daha sonra inkübasyona bırakılan örneklerin 3.5 sa sonunda besiyeri uzaklaştırmış ve 150 µL DMSO eklenerek formazan kristalleri çözülmüştür. 96 kuyucuklu hücre kültür kabına alınan 50 µL'lik hacimler ELISA plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçümü gerçekleştirilerek malzeme yüzeyindeki hücre canlılığı tespit edilmiştir.

### **3.6.3. Canlı/Ölü Hücre Kültürü Çalışmaları**

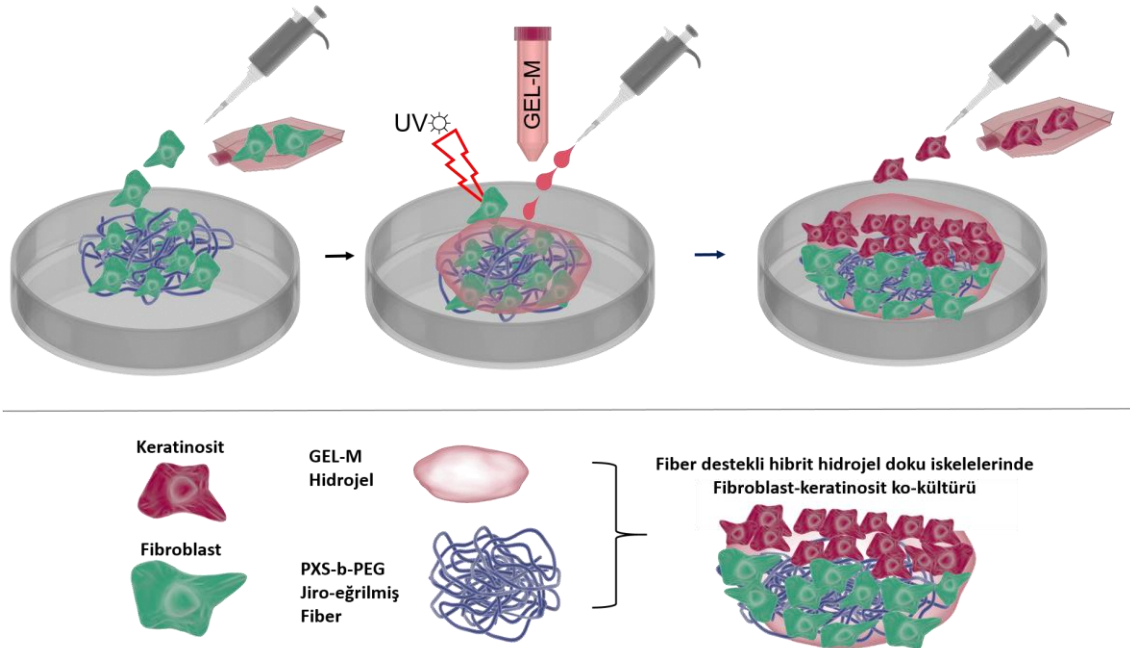
Hazırlanan fiber ve hidrojel yapılarının hücre etkileşimlerinin incelenmesi için floresan canlı/ölü hücre kültürü kiti kullanılmıştır. Kit içeriğinde bulunan Calcein AM hücre boyası canlı hücreleri yeşile boyayarak 494/517 nm bandında absorpsiyon verirken, ethidium homodimer-1 hücre boyası ölü hücreleri kırmızıya boyayarak 517/617 nm bandında absorpsiyon vermektedir. Hücre malzeme etkileşiminin mikroskopik olarak incelenebilmesi için elektro-eğrilmiş fiberler, jiro-eğrilmiş fiberler ve Gel-M hidrojellere zamana bağlı olarak floresan canlı/ölü hücre testi uygulanmıştır. Jiro-eğrilmiş fiberler 1, 4 ve 7. günlerin sonunda belirtilen yöntem ile analiz edilmiştir. Ayrıca Gel-M hidrojel kokültürde kullanılmak üzere seçilen % 7.5 Gel-M hidrojel grubu için 1, 4, 7 ve 14. günlerin sonunda belirtilen yöntem ile analiz edilmiştir.

Yöntemin uygulanması için elektro-eğrilmiş fiberler 48 kuyucuklu hücre kültür kaplarında, jiro-eğrilmiş fiberler ve Gel-M hidrojel yapıları ise 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında hazırlanmıştır. Hazırlanan ve steril edilen örnek gruplarından fiber yapılarına ATCC dermal fibroblast hücreleri ekilirken; Gel-M hidrojel yapılarına ATCC HaCaT keratinosit hücreleri ekilmiştir. Tüm örnek gruplarına  $1 \times 10^5$  hücre/mL derişimdeki hücre süspansiyonundan 100 µL hücre çözeltisi ekilmiştir. Örneklerin besiyerleri 48 saatte bir değiştirilmiştir. Kültürde kullanılan besi yeri; % 90 DMEM (Dulbecco'nun Minimum Esansiyel Ortamı), %10 FBS (Fetal Sığır Serumı), 4 mM L-glutamin, 100 IU/mL penicilin/streptomycin çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış ve kullanımlardan önce 37°C'deki su banyosunda ısıtılmış geri kalan zamanlarda ise 4°C'de saklanmıştır. 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve >%90 nem koşullarında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İlgili inkübasyon sürelerinin sonunda floresan canlı/ölü hücre analizleri gerçekleştirilmiştir. Floresan canlı/ölü

hücre kültür kitinin çözeltisinin hazırlanması için öncelikler kit bileşenleri (Calcein AM, Ethidyum homodimer-1 (EtdH-1)) oda sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra steril PBS içerisinde EtdH-1 stok çözeltisi 500 kat, Calcein AM stok çözeltisi ise 2000 kat seyreltilmiş ve 2  $\mu$ M'lık Calcein AM içeren 4  $\mu$ M'lık EthD-1 solüsyonu hazırlanmıştır. İlgili inkübasyon sürelerinin sonunda hücre kültür kabındaki örnek gruplarının besiyerleri uzaklaştırılarak hazırlanan floresan canlı/ölü hücre kültür kiti çözeltisi kuyucuklara 100-150  $\mu$ L eklenerek 1 sa süre boyunca inkübatörde tutulmuştur. 1 sa sonunda PBS ile yıkanan örnekler floresan mikroskobu (Leica Microsystems, Almanya) ile incelenerek görüntülenmiştir.

### 3.6.4. Ko-kültür Hücre Çalışmaları

Deri modelinin taklit edilmesi için kokültür çalışmaları fibroblast ve keratinosit hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Ortak besi yerinin belirlenmesi için FBS içeren veya içermeyen düşük ve yüksek glikoz içerikli besiyeri kullanılarak, hücre canlılığı test edilmiştir. Bu amaçla MTT testi 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında fibroblast, keratinosit ve kokültür içeren sistemlere uygulanmıştır.



Şekil 3.5. Jiro-eğrilmiş fiber destekli hidrojel doku iskelelerinde fibroblast-keratinosit ko-kültürlerinin şematik gösterimi.

Kokültür sistemindeki hücre canlılığının incelenebilmesi için hücreler farklı floresan renklere işaretlenerek zamana bağlı mikroskopik takibi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Öncelikle, fibroblast ve keratinosit hücreleri ayrı ayrı 75 cm<sup>2</sup>'lik doku kültür kaplarında çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücreler istenilen yoğunluğa ulaştıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmış sonra PBS ile yıkanmış ve tripsin/EDTA çözeltisi kullanılarak enzimatik olarak yüzeyden kaldırılmıştır. Bir miktar besiyeri ile toplanan hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst faz uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelleti besiyeri ile süspansiyon edilerek sayıları belirlenmiş ve floresan boya ile işaretlenmeye hazır hale gelmiştir. "Cell tracker" hücre işaretleme kiti iki bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler CellTracker Yeşil CMFDA (5-klorometilfloresans diasetat) ve CellTracker Kırmızı CMTPX'dir. Bileşenler hazırlanarak fibroblast ve keratinosit hücreleri ayrı ayrı boyanmıştır. Fibroblast hücrelerine Green CMFDA (5-klorometilfloresans diasetat) ile yeşil floresan işaretleme yapılırken, keratinosit hücrelerine Red CMTPX ile kırmızı floresan işaretleme yapılmıştır. Green CMFDA (5-klorometilfloresans diasetat) çözeltisi 20 µM derişimde hazırlanmıştır. Çözücü ortamı olarak DMSO kullanılmıştır. Çözelti daha önce hazırlanan ve sayısı bilinen hücre pelletini süspansiyon etmek için kullanılmıştır. 2mL boya bileşeni ile inkübe edilen hücre süspansiyonu 45 dk inkübatörde tutulmuştur. Daha sonra 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiş üst faz uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 2 mL serumsuz besiyerinde dağıtılmış ve 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra tekrar santrifüj edilmiş ve besi ortamında süspansiyon edilerek 96 kuyucuklu hücre kültür kabında hazırlanan jiro-eğrilmiş fiberlerin üzerine her bir kuyucuğa yeşil floresan boya ile boyanmış 1x10<sup>4</sup> hücre ekilmiştir. 24 sa inkübe edilen hücrelerin üzerine % 7.5 derişimde Gel-M hidrojel çözeltisi (40 µL) eklenerek UV çapraz bağlanarak hazırlanmıştır. Aynı yöntem ile hazırlanan keratinosit hücre pelleti 2 mL Red CMTPX çözeltisi ile 45 dk inkübe edildikten sonra çöktürülmüş ve 30 dk, 2 mL besiyeri ile inkübe edildikten sonra, her bir kuyucukta 1x10<sup>4</sup> hücre ekilecek şekilde süspansiyon edilerek kuyucuklara Gel-M hidrojellerinin üzerine ekilmiştir. Bir, 3 ve 5. günlerin sonunda floresan boyama yapılan hücreler floresan mikroskobu ile gözlemlenmiş ve aynı odak noktalarından elde edilen kırmızı ve yeşil kokültür hücre görüntüleri ImageJ programı ile karşılaştırılarak hazırlanmıştır.



### **3.7. İstatiksel Analiz**

Çalışmalarda, elde edilen sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. Uygulanan testlerde çalışılan örnek grupları arasındaki anlamlı farkların saptanmasında One Way ANOVA testi kullanılmıştır. Farkların istatistiksel değerlendirilmesinde Tukey testinden yararlanılmıştır.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Poli(gliserol) sebakat 2002 yılında polikondenzasyon yöntemi ile ilk kez sentezlenerek biyomalzeme ve doku mühendisliği uygulamalarında dikkat çekici bir malzeme olarak literatürde yerini almıştır. Bunun nedeni ise biyobozunur biyoelastomerler arasında düşük maliyet ve yüksek biyouyumluluk göstermesidir. Ancak ısı kütleme işlemi sonucunda çapraz bağlanması ve daha sonra yaşanan çözünürlük problemi bu polimer grubunun fabrikasyonunu zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda yüksek sıcaklık ve düşük basınç altında gerçekleştirilen uzun süreli ön polimer sentezinde bu polimerlerin kullanımlarını kısıtlamaktadır. Son yıllarda PGS ön polimerlerinin Aydın ve ark. tarafından mikrodalga polimerizasyonu ile sentezlenmesi ile ön polimerizasyon süresi kısaltılarak PGS sentezi kolaylaştırılmıştır [155].

Bu tez kapsamında PGS ve PXS polimerleri ve polietilen glikol ile kopolimerlerinin sentezi mikrodalga polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Daha önce belirtildiği üzere PPS yapılarının sentezlendikten sonra şekillendirilmeleri mümkün değildir. Ayrıca ön polimerlerin şekillendirilerek üretimi sonrasında, çapraz bağlama sırasında viskoz sıvı haline gelen PPS polimerleri fiziksel formlarını kaybetmektedir. Bu sebeple ön polimerlerin biyofabrikasyonu sırasında çapraz bağlama sıcaklığında termal kararlılık sağlayan PVA ile karışım çözeltileri hazırlanarak fiber üretimleri gerçekleştirilmiştir. PGS ve PXS ile genellikle tuz yıkama [162], mikro-kalıp dökme [163] ve elektro-eğirme [164] gibi teknikler kullanılarak doku mühendisliği amaçlı fabrikasyon uygulamaları mevcuttur.

Tez kapsamında ise PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerinin elektrohidrodinamik (EHD) taşınabilir tabanca ve basınçlı jirasyon teknikleri ile fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Fiber üretimi için Sofokleous ve ark. tarafından tasarlanan EHD taşınabilir tabanca cihazı kullanılmış olup [107], basınçlı jirasyon yöntemi için Mahalingam ve ark. tarafından geliştirilen teknik kullanılmıştır [118]. Bu yöntemlerle PPS fiberlerin üretim ilk defa gerçekleştirilmiştir.

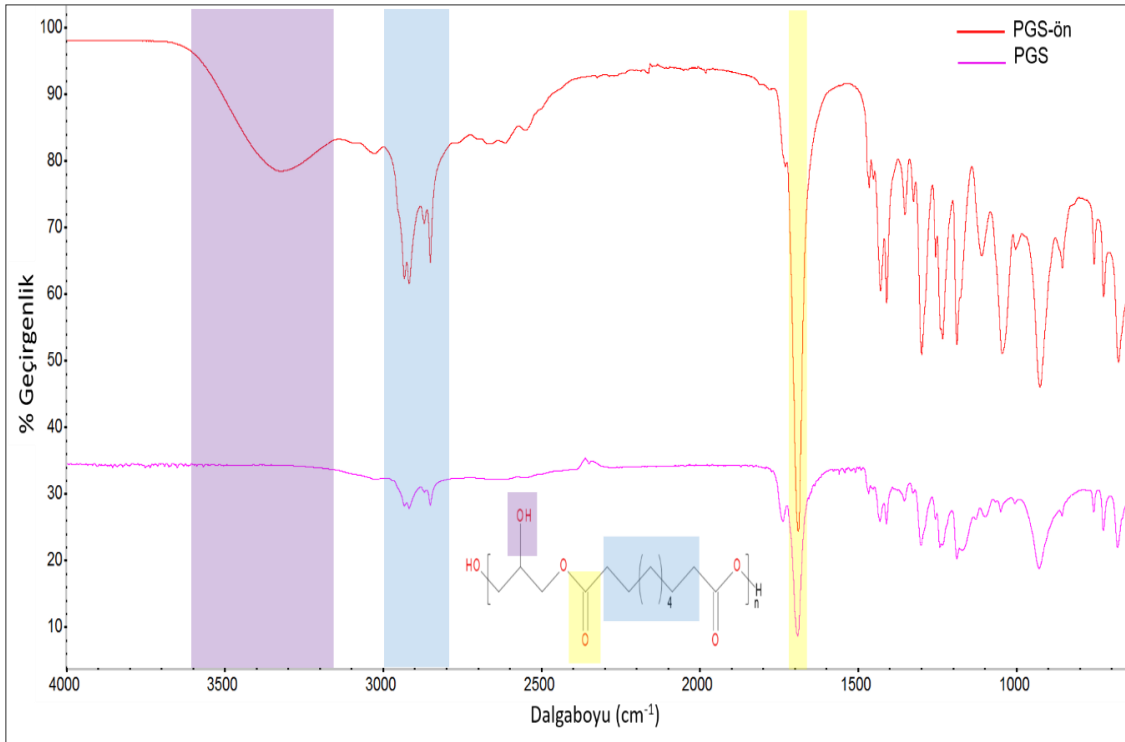
PPS yapılarının fiziksel özellikleri, biyobozunur ve biyouyumlu yapıda olması sebebiyle doku mühendisliği uygulamalarında kullanıma oldukça elverişlidir. PPS polimerleri yumuşak, güçlü ve esnek özelliklerinden dolayı yumuşak doku-doku mühendisliği uygulamalarında geniş uygulama alanı bulmuştur. Vasküler doku mühendisliği, sinir hücreleri için klavuz malzemeler gibi birçok uygulamada PGS temelli malzemeler doku iskelesi olarak kullanılmıştır [165]. Tez kapsamında ise PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerleri sentezlenerek, fiber üretimleri gerçekleştirilmiş ve deri doku mühendisliğine yönelik doku iskelesi olarak potansiyelleri incelenmiştir. Deri dokusundaki dermal-epidermal katmanları taklit edebilmek için elde edilen fiber yapıları hidrojellerle birleştirilerek PPS fiber destekli hibrid doku iskeleleri tasarlanmıştır. Hidrojel olarak gelatin metakrilat (Gel-M) sentezlenerek karakterize edilmiştir. Sentezlenen PPS ve Gel-M polimerik yapılar öncelikle biyouyumlulukları açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra epidermis-dermis katmanlarını taklit edebilmeleri için fiber yapıları dermal fibroblast hücreleri ile, hidrojel yapıları ise keratinosit hücreleri ile etkileşimleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Daha sonra fiber destekli hidrojel doku iskelesinde fibroblast-keratinosit ko-kültürü gerçekleştirilerek hücre davranışları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sırasıyla sunulmaktadır.

#### **4.1. Poli(poliol) Sebakat (PPS) Bazlı Polimerlerin Yapı-Özellik İlişkileri**

Tez kapsamında sentezlenen PPS polimerleri sebasik asit ve poliölün kondenzasyon polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. İlk basamak ön polimerizasyon, ikinci basamak ise kütleme basamağı olarak değerlendirilmektedir. Ön polimerizasyon işlemi mikrodalga destekli polimerizasyon ile sağlanırken, PGS ve PXS polimerleri sebasik asit:poliöl mol oranı 1:1 olacak şekilde sentezlenmiştir. PGS-PEG ve PXS-PEG polimerlerini sentezinde farklı molekül ağırlığındaki (6000, 4000, 2000, 1500 ve 550 g/mol) PEG polimerleri kullanılmıştır. Sebasik asit:poliöl:polietilen glikol'ün farklı mol oranları (Çizelge 3.1) optimize edilerek PPs bazlı biyoelastomerler sentezlenmiştir.

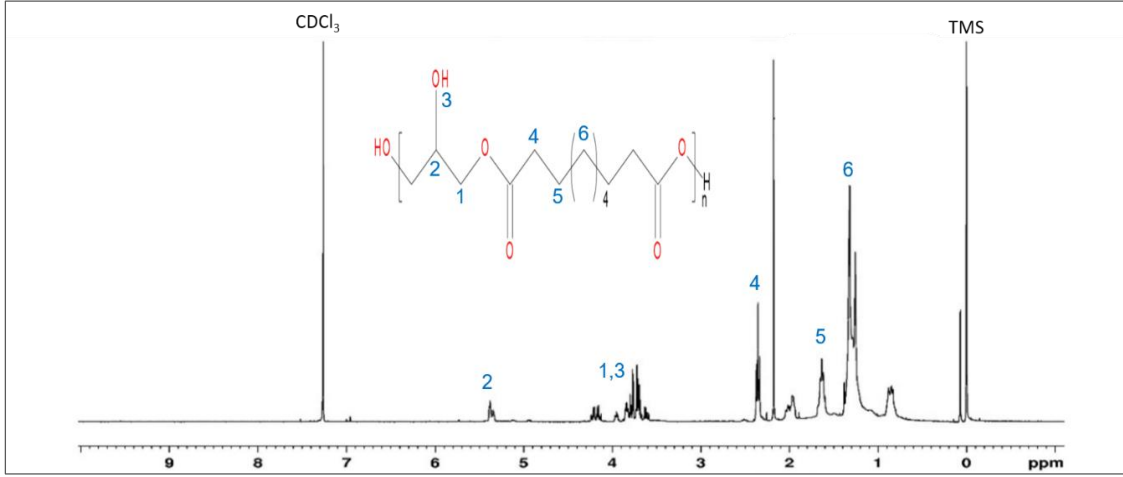
#### 4.1.1. Poli(glisero)l Sebakat (PGS) Polimeri

Mikrodalga polimerizasyon tekniği ile sentezlenen PGS ön polimer yapıları öncelikle FT-IR spektrometresi ile karakterize edilmiştir. . Elde edilen PGS ön ve PGS polimer yapılarının FT-IR spektrumları Şekil 4.1'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. PGS ön polimerin FT-IR spektrumunda 3150-3600  $\text{cm}^{-1}$  dalgaboyu bandında karakteristik –OH gerilimi ve 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  bandında –CH<sub>2</sub> gerilim titreşimi gözlenirken, 1730  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen keskin ester piki (C=O) ön polimer sentezinin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir [5]. Daha sonra kütleme koşulları optimize edilerek 130 °C sıcaklık ve 60 mm Hg basınç altında çapraz bağlanan PGS ön polimerinden PGS polimeri elde edilmiştir. PGS ön polimerinden kondenzasyon polimerizasyonu ile PGS sentezlenmesi, gliserolün kimyasal yapısından gelen hidroksil gruplarının termal etki ile kovalent bağ oluşturarak su çıkışı sağlaması temeline dayanmaktadır. Bu nedenle PGS-ön polimerinde 3150-3600  $\text{cm}^{-1}$  dalgaboyu bandında görülen karakteristik –OH gerilimi, PGS polimerinde kaybolmuştur.



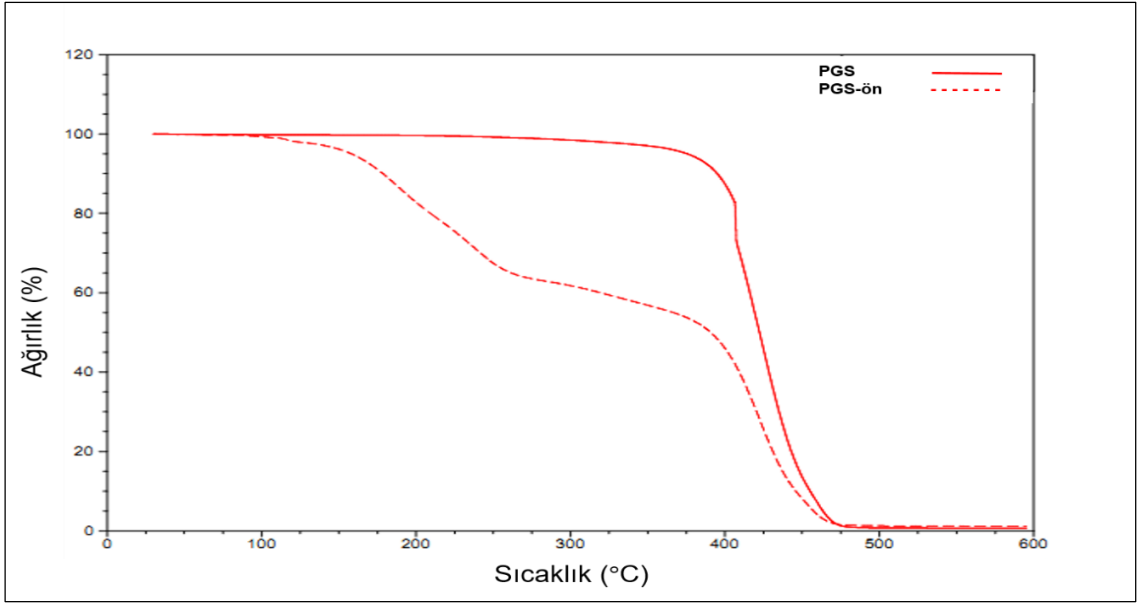
Şekil 4.1. PGS ön ve PGS polimerlerin FT-IR spektrumları.

Sentezlenen PGS ön polimerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu Şekil 4.2’de verilmiştir. Sebasik asit molekülünden gelen metilen pikleri  $\delta$ :1.30, 1.62 ve 2.35 ppm’de literatüre uygun olarak tayin edilmiştir [5]. Ayrıca gliserolden kaynaklı metilen pikleri ise;  $\delta$ :4.1- 4.25 ppm ve  $\delta$ :5.3-5.4 ppm pikleri ile tayin edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında PGS ön polimer yapılarının mikrodalga polimerizasyonu ile başarı ile sentezlendiği doğrulanmıştır.



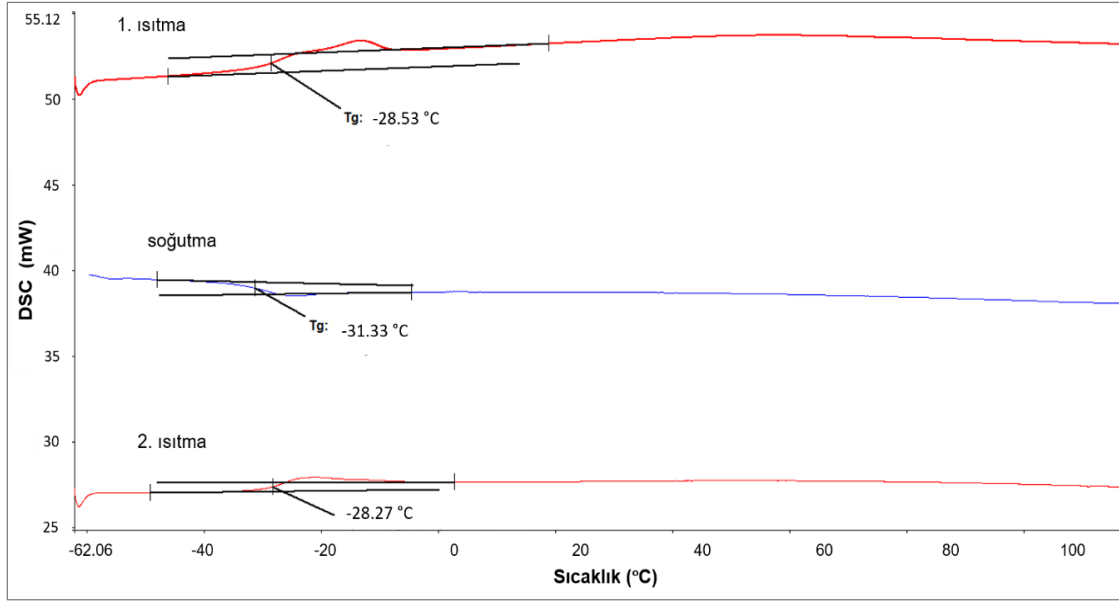
Şekil 4.2. PGS ön polimerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

Sentezlenen PGS ön polimeri ve PGS polimer yapılarının ısıl bozunmaları termal gravimetrik analizler ile belirlenmiştir. PGS ön polimeri ve PGS polimer yapılarının termogramları Şekil 4.3’de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. PGS ön polimerinin termal bozunması ilk basamakta yaklaşık 150 °C’de başlayıp ikinci bozunma 400 °C’de gözlenirken; PGS termal olarak bozunmaya yaklaşık 420 °C’de tek basamakta uğramaktadır. Elde edilen bu veriler ışığında ön polimerin sebasik asit ve gliserol monomerlerine bağlı olarak çoklu termal bozunma noktasına sahip olduğu, çapraz bağlanma sonrası elde edilen PGS polimerinin ise yüksek verimde çapraz bağlanma ile elde edilmesine bağlı olarak kararlılığının arttığı ve tek termal bozunma noktasına sahip olduğu izlenmiştir.



Şekil 4.3. PGS ve PGS ön polimerlerinin TGA termogramları.

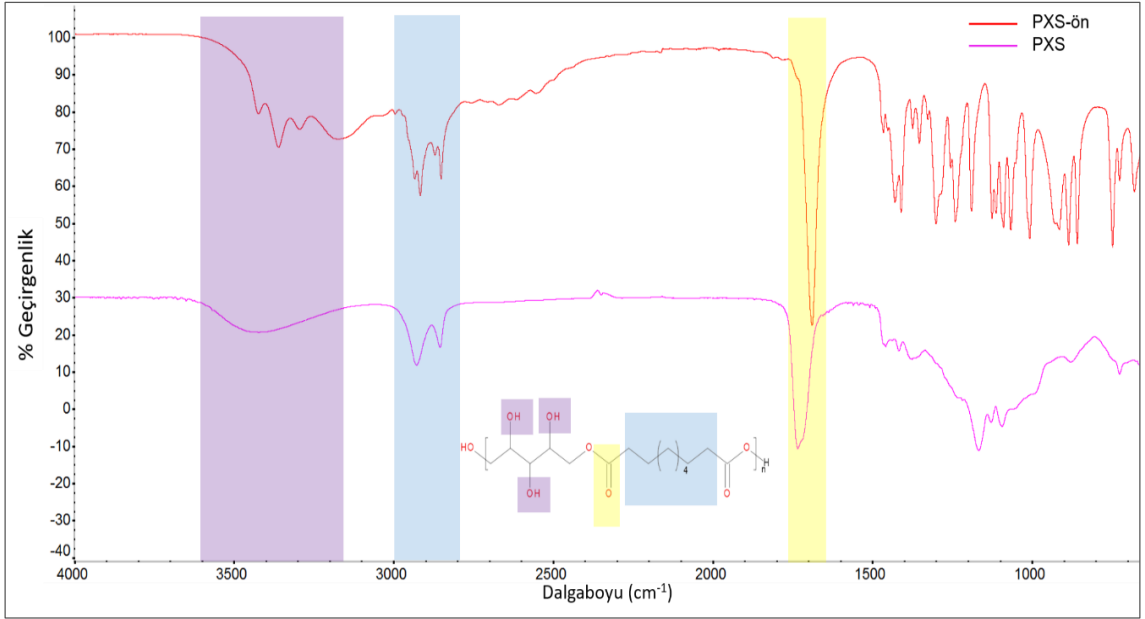
PGS polimerinin termal özelliklerinin incelenmesi ve camsı geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi için DSC analizleri gerçekleştirilmiş olup, DSC termogramları Şekil 4.4'de verilmiştir. DSC termogramları incelendiğinde 1. ısıtmada camsı geçiş sıcaklığı  $-28.53\text{ }^{\circ}\text{C}$  olarak ikinci ısıtmada ise  $-28.27\text{ }^{\circ}\text{C}$  olarak hesaplanmıştır. Tg değerlerinin 2 ısıtmada da birbirine yakın değerlerde çıkması çapraz bağlanma veriminin yüksek olmasından dolayı zincir konformasyonunun kararlı olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca PGS polimerine ait hesaplanan  $-28.53$  Tg değeri, polimerin vücut sıcaklığında amorf yapıda olduğunu ve biyomalzeme uygulamaları için kararlı yapıda olduğunu göstermektedir [33].



Şekil 4.4. PGS polimerinin DSC termogramları.

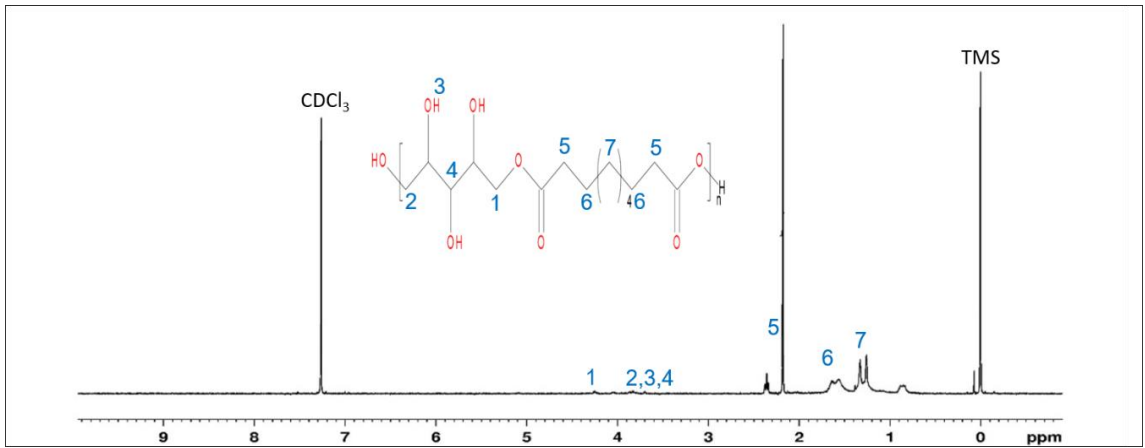
#### 4.1.2. Poli(ksilitol) Sebakat (PXS) Polimeri

Mikrodalga polimerizasyon tekniği ile sentezi gerçekleştirilen PXS ön polimer yapıları da öncelikle FT-IR spektrometresi yardımıyla karakterize edilmiştir. PXS ön polimer ve polimer yapılarına ait FT-IR spektrumları Şekil 4.5’de sunulmuştur. PXS ön polimerinin FT-IR spektrumunda da PGS ön polimerinde gözlemlendiği gibi  $1730\text{ cm}^{-1}$ ’de gözlenen keskin ester piki (C=O) sentezin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca,  $3150\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  bandında gözlenen –OH gerilimi PGS polimerinde tek bir –OH türünü gösterdiği için tek pik olarak elde edilirken, PXS polimerinde ksilitolün yapısından gelen –OH türlerinin çokluğundan dolayı çoklu pik olarak hidroksil bandında yarılmalar gözlenmiştir [30]. PXS ön polimerinden kondenzasyon polimerizasyonu ile PXS sentezlenmesi, ksilitolün kimyasal yapısından gelen hidroksil gruplarının termal etki ile kovalent bağ oluşturarak su çıkışı sağlaması temeline dayanmaktadır. Ksilitolde bulunan kalabalık hidroksil gruplarının çapraz bağlanma sonucunda azalması nedeniyle, PXS-ön polimerinde  $3150\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  dalgaboyu bandında görülen çoklu yarılmış karakteristik –OH geriliminin, PXS polimerinde şiddeti düşmüş ve yarılmaları kaybolmuştur.



Şekil 4.5. PXS ön ve PXS polimerlerinin FT-IR spektrumları.

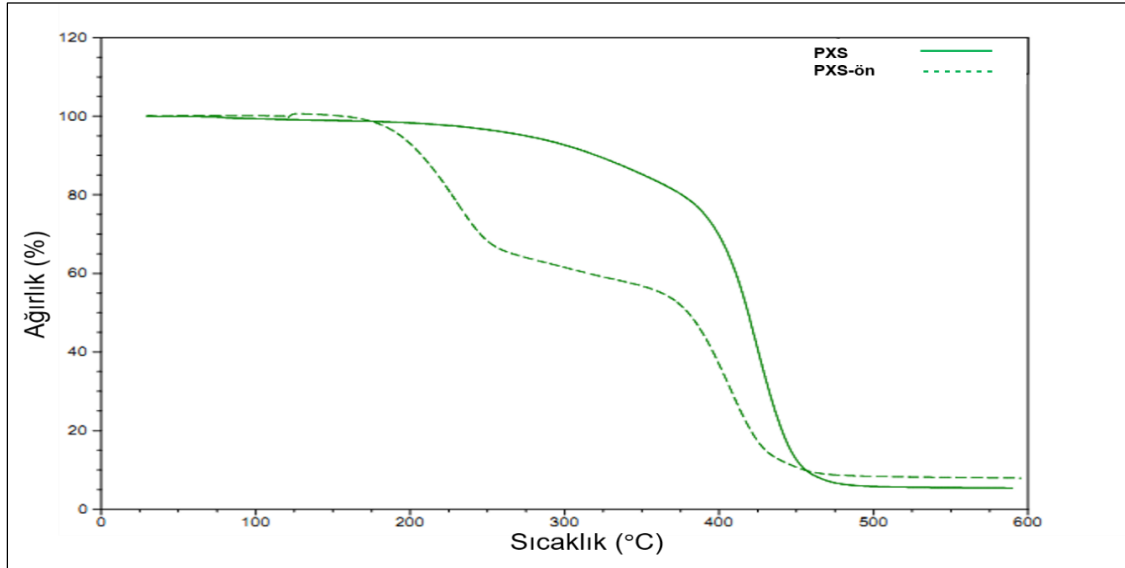
Sentezlenen PXS polimerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları ise Şekil 4.6'da genel spektrum olarak verilmiştir. Sebasik asit kaynaklı metilen pikleri  $\delta$ :1.25, 1.35, 1.62 ve 2.2 ppm'de tayin edilmiştir. Ayrıca ksilitolün metilen pikleri ise;  $\delta$ :3.90-4.25 ppm pikleri ile tayin edilmiştir [30]. Elde edilen veriler ışığında, PXS ön polimerinin de PGS ön polimeri gibi mikrodalga polimerizasyonu ile başarıyla sentezlendiği gösterilmiştir.



Şekil 4.6. PXS ön polimerinin genel  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.



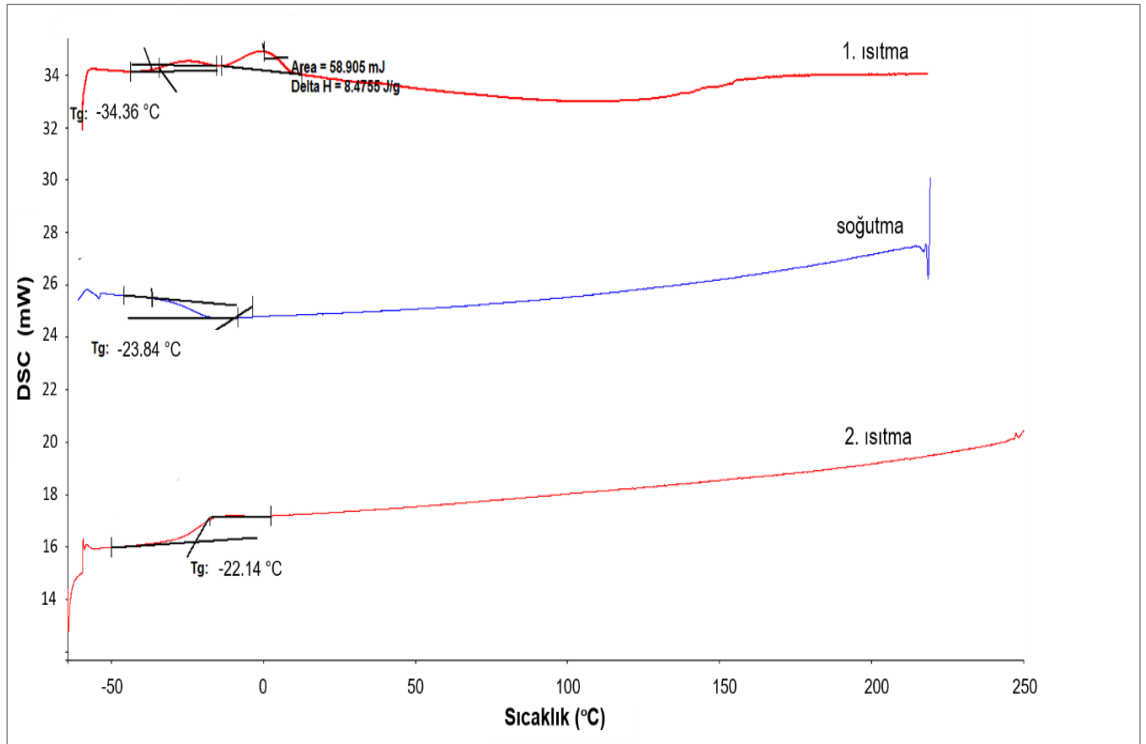
PXS prepolimer ve polimer yapılarının ısıl bozunma özellikleri de termal gravimetrik analizler ile belirlenmiştir. PXS ön polimeri ve PXS polimer yapılarının TGA termogramları Şekil 4.7’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Termal gravimetrik analizlerinin sonucunda PGS’de gözlemediği gibi, ön polimeri iki basamakta ısıl degradasyona uğrarken, polimerin çapraz bağlanması sonucunda PXS’in daha yüksek sıcaklıkta ve kararlılıkta tek basamakta bozunmaya uğradığı tayin edilmiştir. PXS ön polimerindeki termal bozunma ilk basamakta yaklaşık 180 °C’de başlayıp ikinci bozunma 380 °C’de gözlemlenirken; PXS’in termal bozunmaya başladığı sıcaklık PGS’e benzer şekilde yaklaşık 410 °C’de ve tek basamakta gerçekleşmiştir.



Şekil 4.7. PXS ön ve PXS polimerlerinin TGA termogramları.

PGS ve PXS ön polimer yapılarının TGA verileri karşılaştırıldığında, gliserolün ksilitole kıyasla düşük molekül ağırlığının da etkisiyle, şeker alkolü kaynaklı termal bozunma PGS için ilk basamakta daha düşük sıcaklıkta tayin edilmiştir. İkinci basamaktaki bozunma ise, yaklaşık 380 °C’de sebasik asit kaynaklı olduğundan ortak pik değeri gözlenmiştir. Diğer taraftan ısıl çapraz bağlanma sonucu elde edilen PGS ve PXS polimer yapıları termal bozunma açısından değerlendirildiğinde çapraz bağlanma derecesi (esterifikasyon derecesi) yüksek olan PGS polimeri PXS’e kıyasla yüksek kararlılık göstererek, daha yüksek sıcaklıkta bozunmaya uğramıştır.

PXS polimerine ait DSC termogramları Şekil 4.8'de verilmiştir. DSC termogramları incelendiğinde 1. ısıtmada camı geçiş sıcaklığı  $-34.36\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ikinci ısıtmada ise  $-22.14\text{ }^{\circ}\text{C}$  olarak hesaplanmıştır. 1. ve 2. ısıtma eğrileri arasında oluşan fark örneklerin  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ısıtılıp soğutulması sırasında serbest hacimin düşmesinden kaynaklanmaktadır. 1. ısıtmada PGS polimerinin Tg değeri  $-28.53\text{ }^{\circ}\text{C}$  iken, PXS polimerinin Tg değerinin  $-34.36\text{ }^{\circ}\text{C}$  olması ksilitol monomerinden kaynaklanan esnek zincirlerin etkisinden gelmektedir. Ayrıca 1. ısıtmada hareketlenen esnek zincirler kademeli ısıtma ve soğutmanın etkisiyle konformasyonlarını daha kararlı hale getirmektedir. PXS polimerinin  $-34.36\text{ }^{\circ}\text{C}$  olarak belirlenen Tg değeri, oda sıcaklığında ve vücut sıcaklığında ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) kauçuksu davranış sergilemesi bu polimerlerin biyomalzeme uygulamaları için uygun olduğunu göstermektedir [166].



Şekil 4.8. PXS polimerinin DSC termogramları.

PGS ve PXS polimerlerine ait gerilim-gerinim eğrileri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.9 ve Çizelge 4.1'de verilmiştir. Gerilim-gerinim grafiğinin doğrusu üzerinden elde edilen eğim değeri hesaplanarak PGS elastomerinin Young's modülüs değeri belirlenmiştir. PGS polimerine ait Young modülüs değeri  $0.21\pm 0.02\text{ MPa}$

ve gerinim değeri ise ~%70 olarak bulunmuştur. Literatürde PGS polimerine ait Young's modülüs değeri çapraz bağlama sıcaklığı, süresi ve yüzdesine bağlı olarak farklılık göstermekte olup, 0.025-1.200 MPa aralığında değişkenlik gösterirken, yüzde uzama miktarının % 30-330 aralığında olduğu belirtilmiştir [5, 27, 167]. Tez kapsamında sentezlenen PGS polimerinin mekanik özelliklerinin literatür verileri ile benzer olduğu görülmüştür.

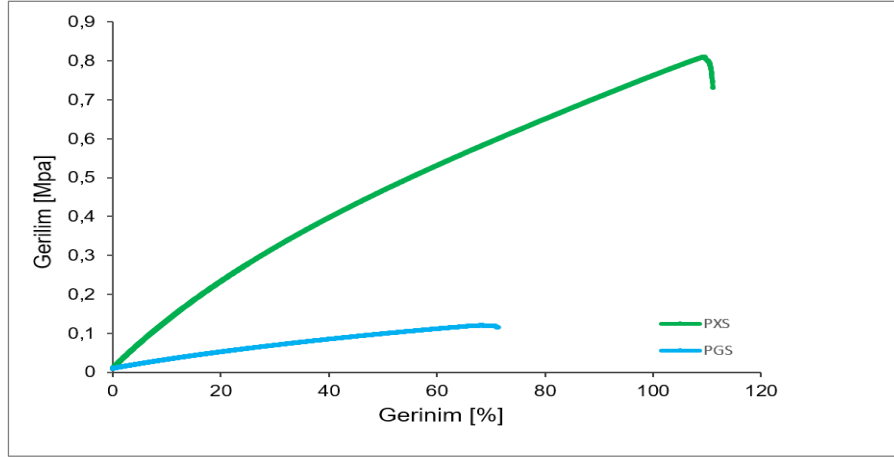
PXS polimerine ait Young modülüs değeri ise,  $1.20 \pm 0.01$  MPa bulunmuştur. PXS elastomerine ait ortalama maksimum uzama miktarı ise, ~%100 olarak belirlenmiştir. PXS polimerine ait Young's modülüs değeri literatürde 0.05-2.00 MPa aralığında tayin edilirken gerinim değeri % 750'ye kadar artabilmektedir [168]. Sentezlenen PXS polimerinin mekanik özellikleri çapraz bağlanma süresi ve sıcaklığı da gözönünde bulundurularak literatürde verilen sonuçlar ile benzer olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1. Poli(poliol) Sebakat (PPS) bazlı polimerlerin mekanik özellikleri.

	<b>Elastik modülüs</b> <b><math>E_t</math> (MPa)</b>	<b>Kopma dayanımı</b> <b><math>\sigma_M</math> (MPa)</b>	<b>Kopma noktasındaki yüzde uzama</b> <b><math>\epsilon_B</math> (%)</b>
<b>PGS</b>	0.21±0.020	0.11±0.010	67±4.6
<b>PXS</b>	1.20±0.010	0.73±0.070	99±10.6
<b>PGS-ko-PEG</b>	0.31±0.010	0.27±0.030	152±7.6
<b>PXS-ko-PEG</b>	0.06±0.004	0.05±0.004	160±5.0

PXS polimerinin xylitol monomerlerinin uzun zincirleri ve çapraz bağlamada etkili olan hidroksil gruplarının ve molekül ağırlığının, PGS'te kullanılan gliserol monomerine oranla fazla olması sebebiyle mekanik özellikleri daha geniş bir aralık göstermektedir. PPS polimerlerinin kütleme süresi arttıkça % uzama miktarlarında azalma gözlenmektedir [168]. Ayrıca, PGS ve PXS polimerlerinin elastomerik polimer haline gelebilmesi için gereken kütleme süresi de monomerlere göre değişiklik göstermektedir. Sonuç olarak, PPS yapılarının sentezlenebilmesi için ihtiyaç duyulan reaksiyon koşullarındaki ve kimyasal yapıdaki farklılıklar mekanik özelliklerdeki varyasyonları da ortaya koymaktadır.

Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, PGS ve PXS polimerlerine ait gerilim-gerinim eğrileri ve Young's modülüs değerleri literatür ile benzer sonuçlar içermektedir.



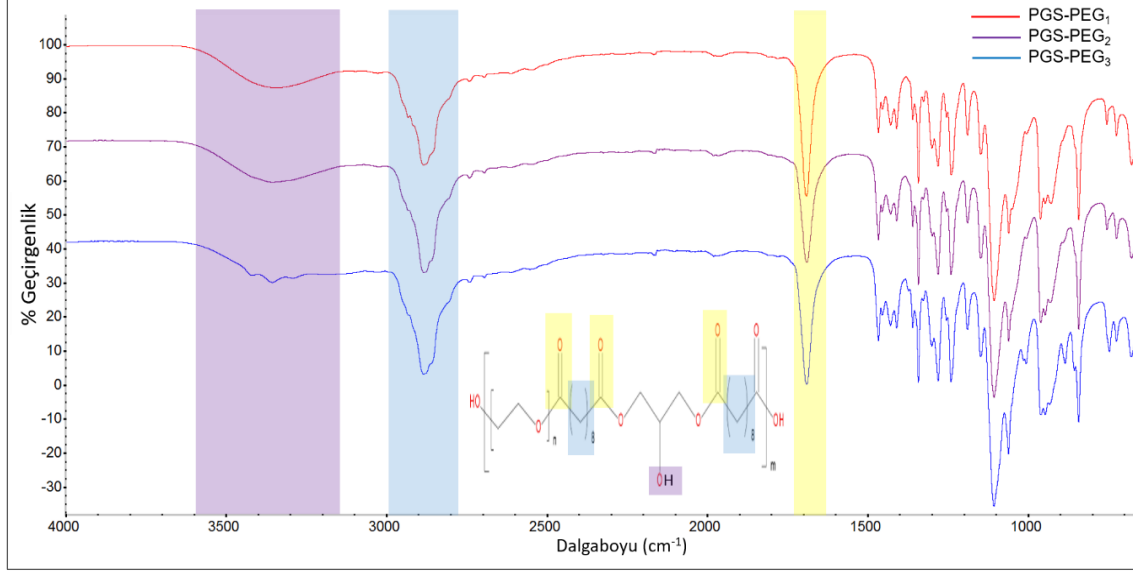
Şekil 4.9. PGS ve PXS polimerlerinin gerilim-gerinim eğrileri.

#### 4.1.3. Poli(glisero)Sebakat-ko-Poli(etilen glikol) Kopolimeri

PGS-ko-PEG ön polimeri yöntem kısmında belirtildiği gibi mikrodalga destekli kondenzasyon polimerizasyon yöntemi ile iki basamakta sentezlenmiştir. Sentezlenen kopolimer yapılarında farklı molekül ağırlığında (550, 1500, 2000, 4000, 6000 g/mol) PEG polimerleri kullanılmıştır. Sentez sırasında kullanılan mol oranları Bölüm 3.2.2.2.'de Çizelge 3.1'de verilmiştir. PEG:sebasik asit: gliserol mol oranlarının optimizasyonu için; öncelikle 2000 g/mol molekül ağırlığında PEG kullanılarak 0.125:1:1 (PGS-PEG<sub>1</sub>), 0.25:1:1 (PGS-PEG<sub>2</sub>) ve 0.5:1:1 (PGS-PEG<sub>3</sub>) mol oranlarında PGS-ko-PEG ön polimerleri sentezlenmiştir.

Sentezlenen PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>2</sub> ve PGS-PEG<sub>3</sub> ön polimer yapılarının FT-IR spektrumları Şekil 4.10'da verilmiştir. PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>2</sub> ve PGS-PEG<sub>3</sub> ön polimer yapılarının FT-IR spektrumlarında da PGS ve PXS yapılarında gözlemlendiği gibi 1730 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen keskin ester piki (C=O) sentezin başarı ile gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Ayrıca, 3150-3600 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenen -OH gerilimi, 2800-3000 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenen -CH<sub>2</sub> titreşimi ve ester bağının

sentezlendiğini kanıtlayan  $1730\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen keskin ester piklerinin şiddetinde meydana gelen değişimlerin PEG molekül ağırlığı ve sentez mol oranları ile orantılı olarak değiştiği gösterilmiştir.



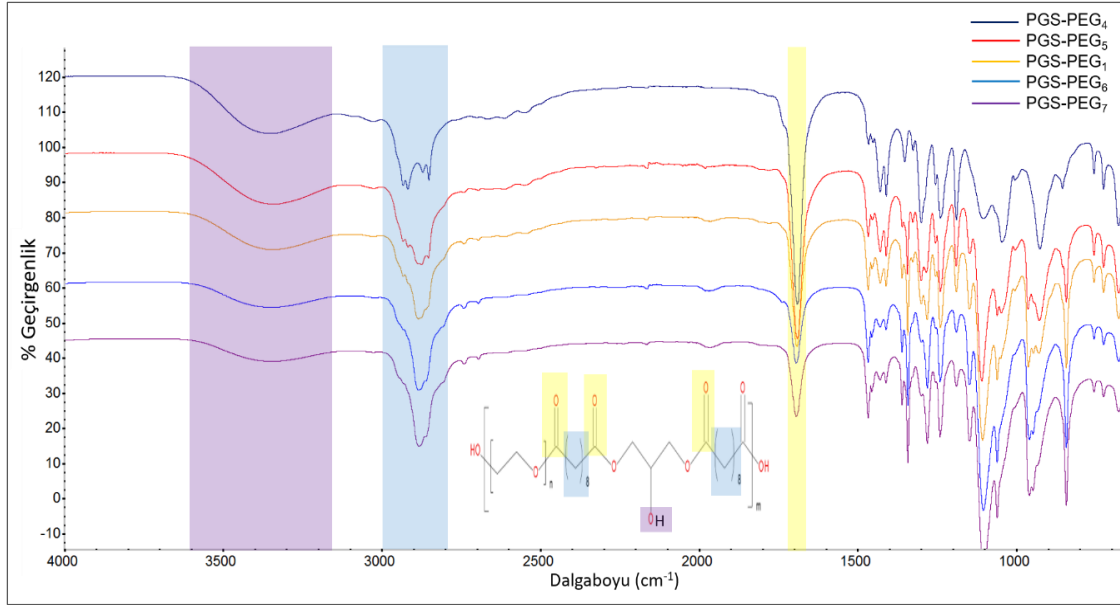
Şekil 4.10. PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>2</sub> ve PGS-PEG<sub>3</sub> ön polimerlerinin FT-IR spektrumları.

Ester bağının sentezlenmesiyle  $\text{CH}_2/\text{OH}$  oranlarında meydana gelen değişim Çizelge 4.2'de FT-IR spektroskopisinde  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  bandında gözlenen  $-\text{CH}_2$  titreşimi ve  $3150\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  bandında gözlenen  $-\text{OH}$  gerilim alan değerlerinin integrasyon oranları üzerinden hesaplanarak verilmiştir. PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>2</sub> ve PGS-PEG<sub>3</sub> polimerlerinin  $\text{CH}_2/\text{OH}$  oranları sırasıyla 1.29, 1.47 ve 2.2 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında, PEG molekül ağırlığı arttıkça ön polimerindeki serbest hidroksil grubu oranının düştüğü ve esterifikasyon derecesinin de paralel olarak azalacağı sonucuna varılmış ve diğer molekül ağırlığındaki PEG molekülleri ile gerçekleştirilecek sentezlere PGS-PEG<sub>1</sub> sentez mol oranları ile devam edilmesine karar verilmiştir. Ayrıca PGS-PEG<sub>4</sub>, PGS-PEG<sub>5</sub>, PGS-PEG<sub>6</sub> ve PGS-PEG<sub>7</sub> polimerlerinin  $\text{CH}_2/\text{OH}$  oranları sırasıyla 0.74, 0.93, 1.9 ve 2.14 olarak hesaplanmıştır. Ön polimer yapsındaki PEG moleküllerinin molekül ağırlığındaki artışa paralel olarak  $\text{CH}_2/\text{OH}$  oranı da artış göstermiş ve serbest  $-\text{OH}$  gruplarının oranı düşerek çapraz bağlanma yoğunluğunun da azalma göstereceği belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. PGS ve PGS-*ko*-PEG polimerlerinin–CH<sub>2</sub> ve –OH gruplarının FT-IR spektroskopisi piklerinin alan değerlerinin integrasyon oranları.

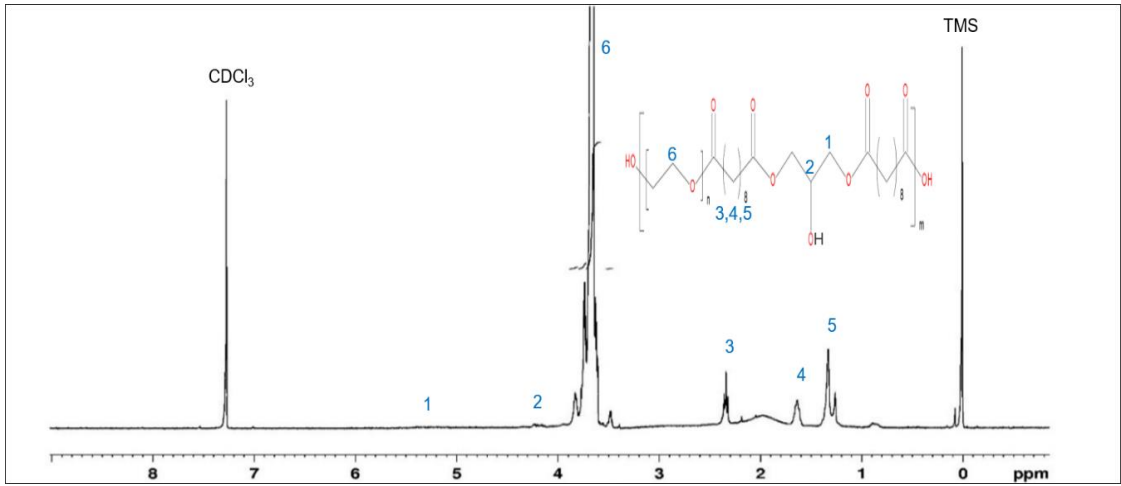
Polimer	CH <sub>2</sub> (2800-3000 cm <sup>-1</sup> )	OH (3150-3600 cm <sup>-1</sup> )	(CH <sub>2</sub> /OH) Oranı
PGS	1690	2563	0.66
PGS-PEG <sub>1</sub>	2541	1977	1.29
PGS-PEG <sub>2</sub>	2826	1916	1.47
PGS-PEG <sub>3</sub>	2764	1256	2.20
PGS-PEG <sub>4</sub>	1870	2524	0.74
PGS-PEG <sub>5</sub>	2121	2280	0.93
PGS-PEG <sub>6</sub>	2760	1449	1.90
PGS-PEG <sub>7</sub>	2786	1302	2.14

Şekil 4.11’de farklı molekül ağırlığındaki (550, 1500, 2000, 4000 ve 6000 g/mol) PEG ile sentezlenen PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>4</sub>, PGS-PEG<sub>5</sub>, PGS-PEG<sub>6</sub> ve PGS-PEG<sub>7</sub> ön polimer yapılarının FT-IR spektrumları verilmiştir. Elde edilen spektrumlar incelendiğinde Şekil 4.10’da elde edilen spektrumlara benzer şekilde keskin ester piki (C=O) 1730 cm<sup>-1</sup>’de gözlenmiştir. 3150-3600 cm<sup>-1</sup> bandında görülmesi beklenen –OH ve 2800-3000 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenmesi gereken –CH<sub>2</sub> pikleri de başarıyla gözlenmiştir. PEG molekül ağırlığındaki artışa bağlı olarak ester (1730 cm<sup>-1</sup>) ve hidroksil (3150-3600 cm<sup>-1</sup>) gruplarının karakteristik pik şiddetleri azalırken, 2800-3000 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenen –CH<sub>2</sub> pik şiddetleri PEG zincir uzunluğu artışıyla doğru orantılı olarak artış göstermiştir.

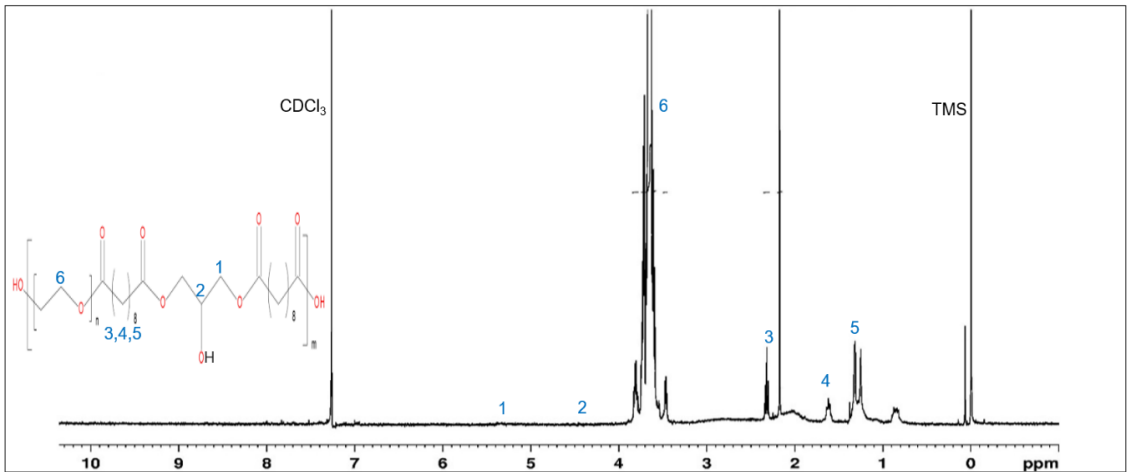


Şekil 4.11. PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>4</sub>, PGS-PEG<sub>5</sub>, PGS-PEG<sub>6</sub> ve PGS-PEG<sub>7</sub> ön polimerlerinin FT-IR spektrumları.

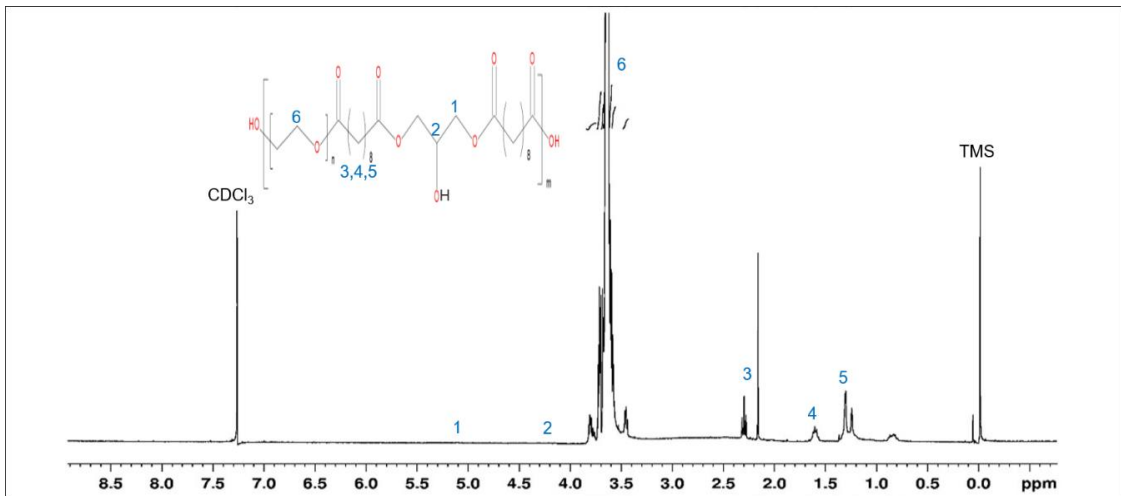
Sentezlenen PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>2</sub>, PGS-PEG<sub>3</sub>, PGS-PEG<sub>4</sub>, PGS-PEG<sub>5</sub>, PGS-PEG<sub>6</sub> ve PGS-PEG<sub>7</sub> ön polimer yapılarının <sup>1</sup>H-NMR spektrumları Şekil 4.12-4.18'de genel spektrumları ile verilmiştir. <sup>1</sup>H-NMR spektrumlarında sebasik asit kaynaklı metilen pikleri  $\delta$ :1.25, 1.35, 1.62 ve 2.35 ppm'de, gliserol kaynaklı metilen pikleri ise;  $\delta$ :4.1- 4.25 ppm ve 5.3-5.4 ppm pikleri ile tayin edilmiştir. Gliserol kaynaklı metilen piklerinin düşük şiddete sahip olması polietilen glikol molekülünden gelen metilen gruplarının yüksek şiddetine bağlı olarak tekil -OH uç gruplarının düşük şiddete sahip olması ile açıklanmaktadır. Polietilen glikol yapılarındaki kalabalık metilen grupları ise,  $\delta$ :3.60- 3.80 ppm'de gözlenen şiddetli metilen piki ile karakterize edilmektedir.



Şekil 4.12. PGS-PEG<sub>1</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

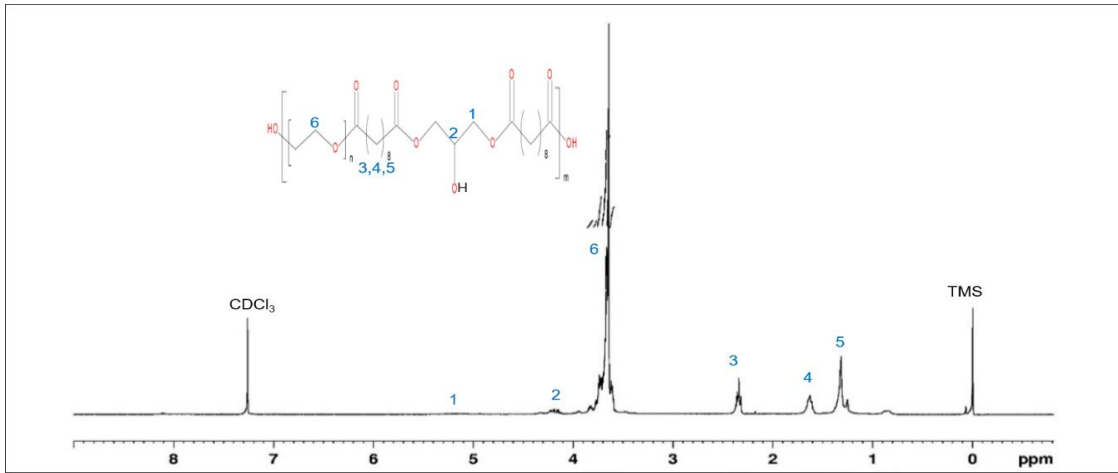


Şekil 4.13. PGS-PEG<sub>2</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

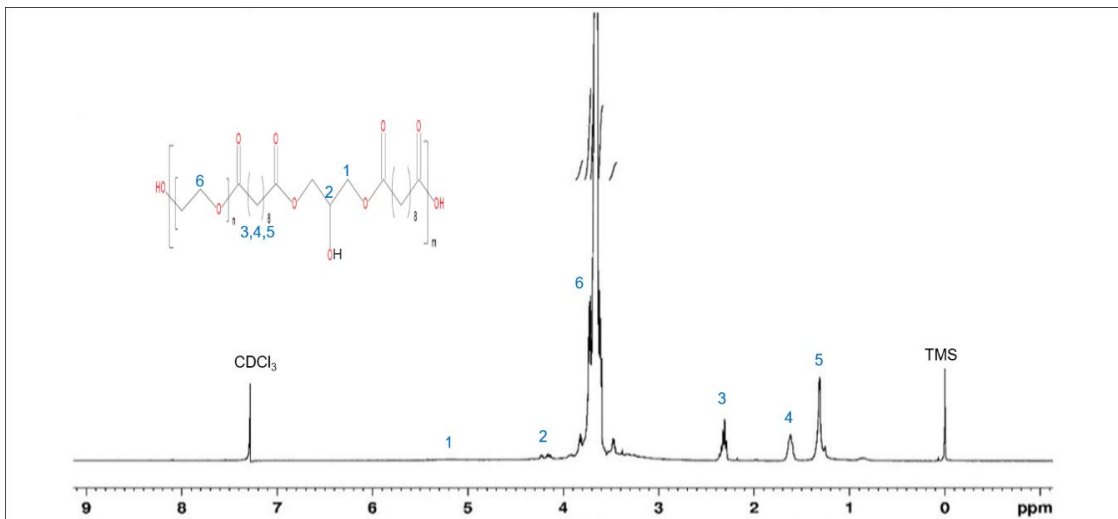


Şekil 4.14. PGS-PEG<sub>3</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

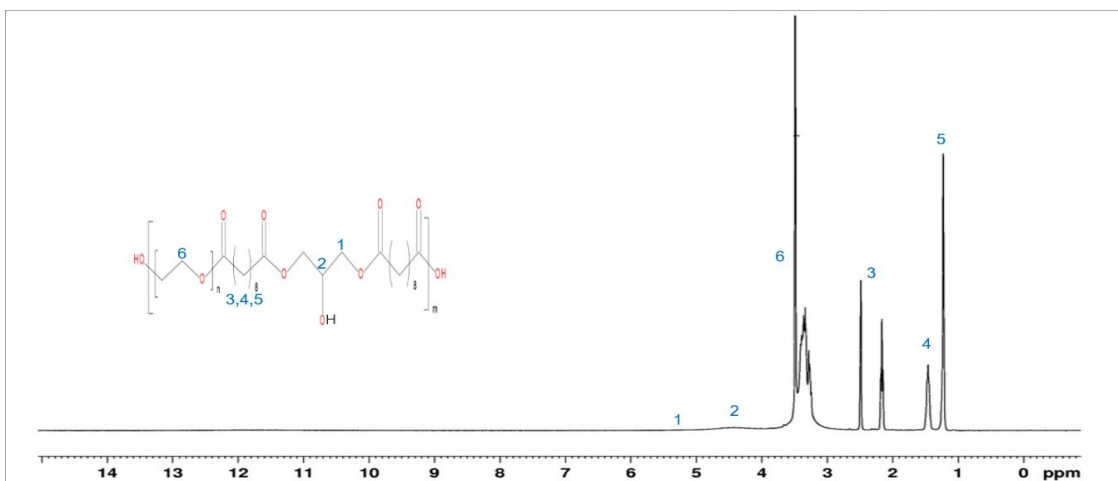




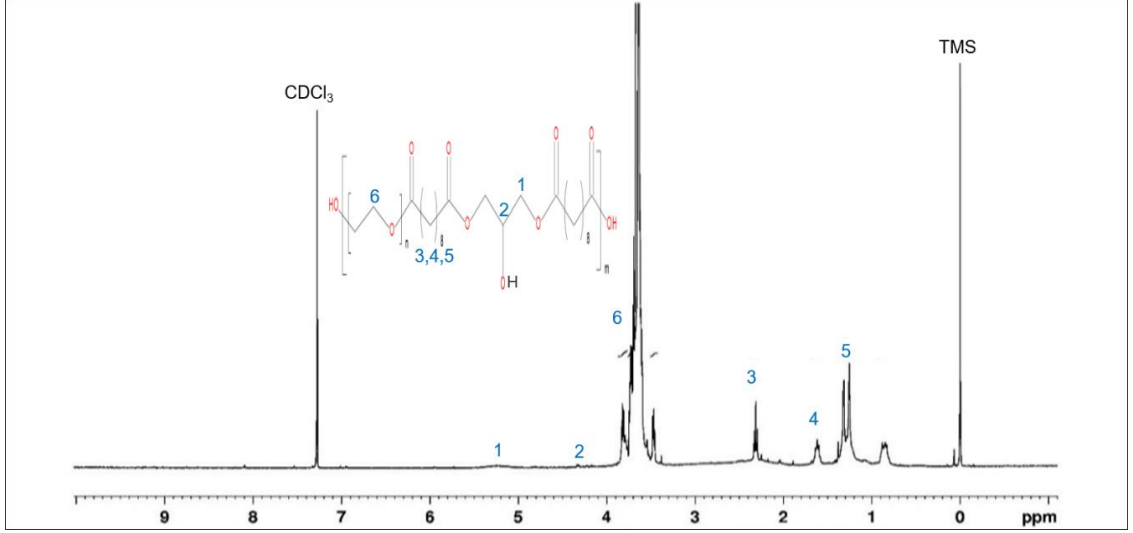
Şekil 4.15. PGS-PEG<sub>4</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.



Şekil 4.16. PGS-PEG<sub>5</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.



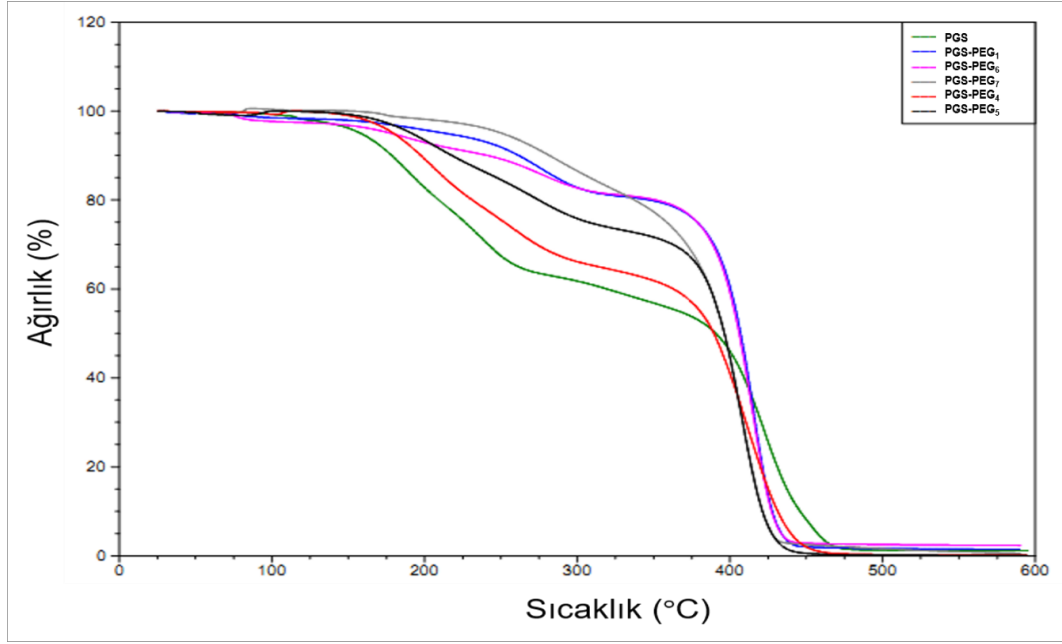
Şekil 4.17. PGS-PEG<sub>6</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.



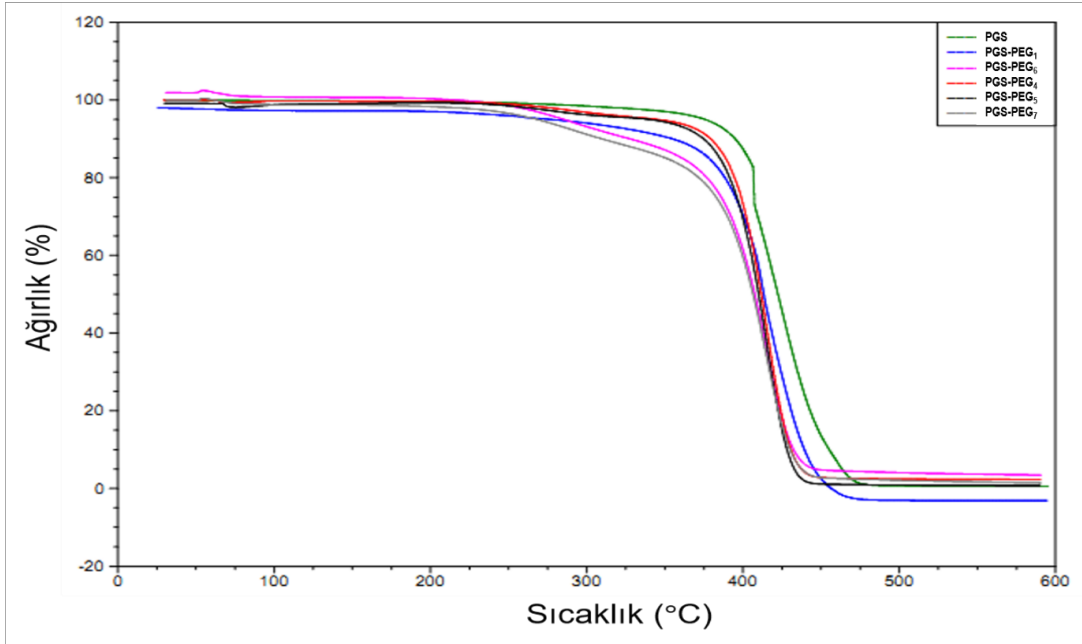
Şekil 4.18. PGS-PEG<sub>7</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

Ayrıca Şekil 4.19 ve 4.20'de PGS, PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>4</sub>, PGS-PEG<sub>5</sub>, PGS-PEG<sub>6</sub> ve PGS-PEG<sub>7</sub> ön polimer ve polimer yapılarının termal bozunma eğrileri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Ön polimer yapıları iki basamakta ısıl bozunmaya uğrarken, ön polimerlerin çapraz bağlanması sonucunda elde edilen polimerin daha yüksek sıcaklıkta ve kararlılıkta bozunmaya uğradığı tayin edilmiştir. Örneğin, PGS-PEG<sub>1</sub> ön polimerinde termal bozunma ilk basamakta yaklaşık 250 °C'de başlayıp ikinci bozunma yaklaşık 400 °C'de gözlemlenirken; PGS-PEG<sub>1</sub> polimeri termal bozunmaya PGS'e benzer şekilde yaklaşık 400 °C'de tek basamakta uğramaktadır. PGS-PEG<sub>4</sub> polimeri yaklaşık 400 °C'de bozunmaya uğrarken, PGS-PEG<sub>4</sub> ön polimeri ilk basamakta 180 °C'de, ikinci basamakta 380 °C'de bozunma termogramı göstermiştir. PGS-PEG<sub>5</sub> polimer ve ön polimerlerinin TGA verilerinde de, ön polimer iki basamakta ısıl bozunma gösterirken çapraz bağlanma işlemi sonrası tek basamakta 400 °C'de bozunma eğrisi gözlenmiştir. Farklı molekül ağırlığında PEG kullanılarak sentezlenen ön polimer yapılarının termal kararlılıkları karşılaştırıldığında, artan PEG molekül ağırlığına bağlı olarak ön polimerdeki termal kararlılığı artırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Ön polimer yapıları karşılaştırıldığında PGS'in en hızlı termal bozunmaya sahip olduğu ve artan PEG molekül ağırlığına bağlı olarak termal bozunma hızı ve derecesinin artış gösterdiği bulunmuştur. Ancak çapraz bağlanan polimer yapıları karşılaştırıldığında termal açıdan en kararlı polimer PGS olarak bulunmuş ve artan PEG molekül ağırlığı termal kararlılıkla ters

orantılı bulunmuştur. Bunun sebebi esterifikasyonun PGS polimerinde en fazla olması ile açıklanmaktadır.



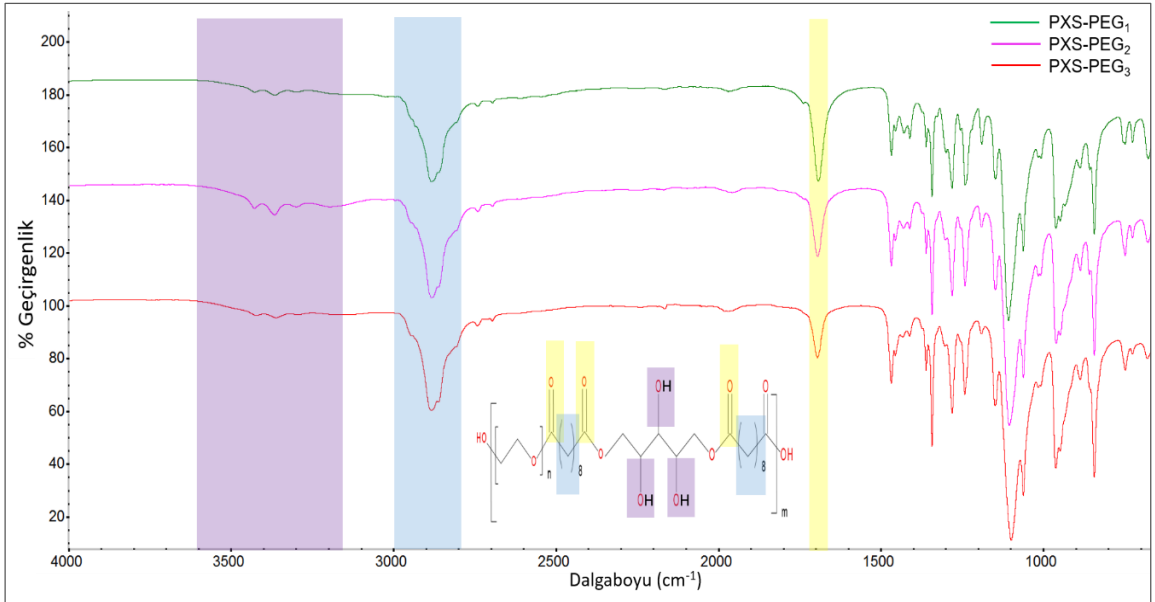
Şekil 4.19. PGS, PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>4</sub>, PGS-PEG<sub>5</sub>, PGS-PEG<sub>6</sub> ve PGS-PEG<sub>7</sub> ön polimerlerinin TGA termogramları.



Şekil 4.20. PGS, PGS-PEG<sub>1</sub>, PGS-PEG<sub>4</sub>, PGS-PEG<sub>5</sub>, PGS-PEG<sub>6</sub> ve PGS-PEG<sub>7</sub> polimerlerinin TGA termogramları.

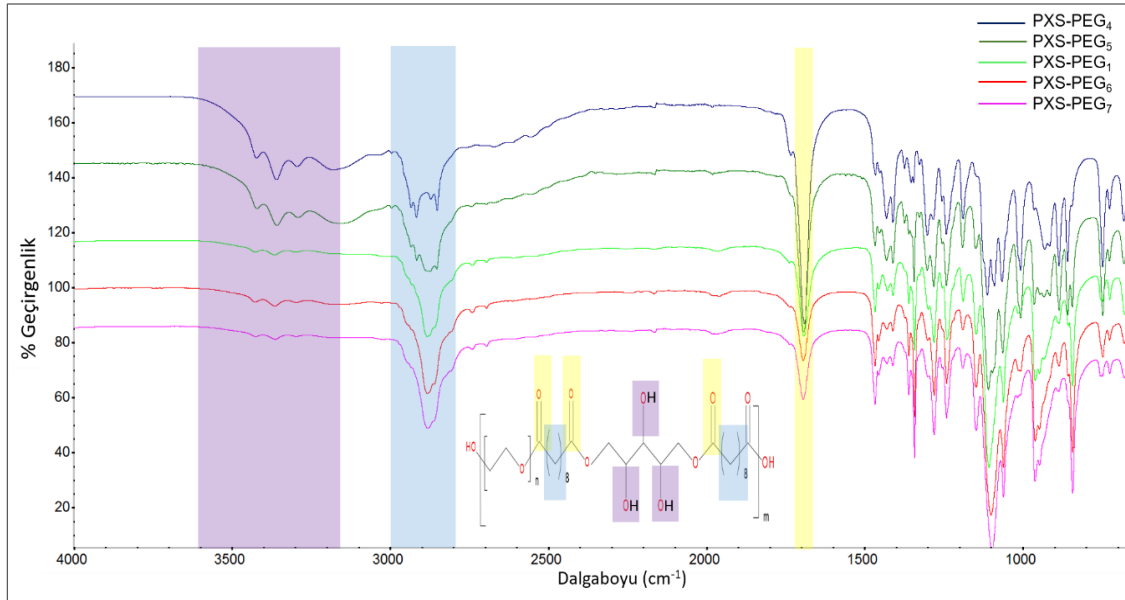
#### 4.1.4. Poli(ksilitol) Sebakat-ko-Poli(etilen) Glikol Kopolimeri

PXS-ko-PEG polimer yapıları da PGS-ko-PEG sentezi ile benzer şekilde mikrodalga destekli kondenzasyon polimerizasyon yöntemi ile iki basamakta sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin mol oranları detaylı olarak daha önce Bölüm 3.2.2.2'de Çizelge 3.1'de sunulmuştur. PXS-ko-PEG polimerleri de PGS-ko-PEG polimerleri gibi öncelikle 2000 g/mol PEG molekülleri ile farklı mol oranlarında sentezlenmiştir. Şekil 4.21'de belirtilen PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>2</sub> ve PXS-PEG<sub>3</sub> ön polimer yapılarının FT-IR spektrumlarında 1730 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen ester pikleri (C=O) sentezlerin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Sentezlenen tüm polimer gruplarında, ksilitolün çoklu –OH grupları 3150-3600 cm<sup>-1</sup> bandındaki piklerdeki yarılmalari doğrulamaktadır. Spektrumlarda 3150-3600 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenen –OH piki, 2800-3000 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenen –CH<sub>2</sub> piki ve ester bağının sentezlendiğini kanıtlayan 1730 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen ester piklerinin şiddetinde meydana gelen değişimlerin sabit PEG molekül ağırlığında, değişen sentez mol oranlarına bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Artan PEG mol oranı özellikle, 1730 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen ester piklerinin (C=O) şiddetinde azalmaya yol açmıştır.



Şekil 4.21. PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>2</sub> ve PXS-PEG<sub>3</sub> ön polimerlerinin FT-IR spektrumları.

PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>4</sub>, PXS-PEG<sub>5</sub>, PXS-PEG<sub>6</sub> ve PXS-PEG<sub>7</sub> ön polimer yapılarının FTIR spektrumları da karşılaştırmalı olarak Şekil 4.22'de verilmiştir. Elde edilen spektrumlarda, 1730 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen ester pikleri (C=O) sentezlerin başarıyla gerçekleştirildiğini doğrularken, 3150-3600 cm<sup>-1</sup> bandındaki –OH piklerinde görülen yarımalar ksilitolün çoklu –OH gruplarını doğrulamaktadır. –CH<sub>2</sub> gruplarının varlığı ise 2800-3000 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenen metilen pikleri ile doğrulanmıştır. Ayrıca aynı mol oranlarında sırasıyla 550, 1500, 2000, 4000 ve 6000 g/mol molekül ağırlığında PEG kullanılarak hazırlanan polimer gruplarında PEG kaynaklı molekül ağırlığı artışına bağlı metilen pik şiddetinde artış gözlenmiştir.



Şekil 4.22. PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>4</sub>, PXS-PEG<sub>5</sub>, PXS-PEG<sub>6</sub> ve PXS-PEG<sub>7</sub> ön polimerlerinin FT-IR spektrumları.

Ester bağının sentezlenmesiyle CH<sub>2</sub>/OH oranlarında meydana gelen değişim Çizelge 4.3'de verilmiştir. CH<sub>2</sub>/OH oranlarında meydana gelen değişim, 2800-3000 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenen –CH<sub>2</sub> ve 3150-3600 cm<sup>-1</sup> bandında gözlenen –OH piklerinin alan değerlerinin integrasyon oranları üzerinden hesaplanmıştır. PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>2</sub> ve PXS-PEG<sub>3</sub> polimerlerinin CH<sub>2</sub>/OH oranları sırasıyla 0.92, 1.75 ve 2.94 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında, PEG molekül ağırlığı arttıkça ön polimerdeki serbest hidroksil grubu oranının düştüğü ve esterifikasyon derecesinin de paralel olarak azalacağı sonucuna varılmış ve

diğer molekül ağırlığındaki PEG molekülleri ile gerçekleştirilecek sentezlere G2 sentez mol oranları ile benzer şekilde PXS-PEG<sub>1</sub> örnek grubunda kullanılan mol oranları ile devam edilmesine karar verilmiştir.

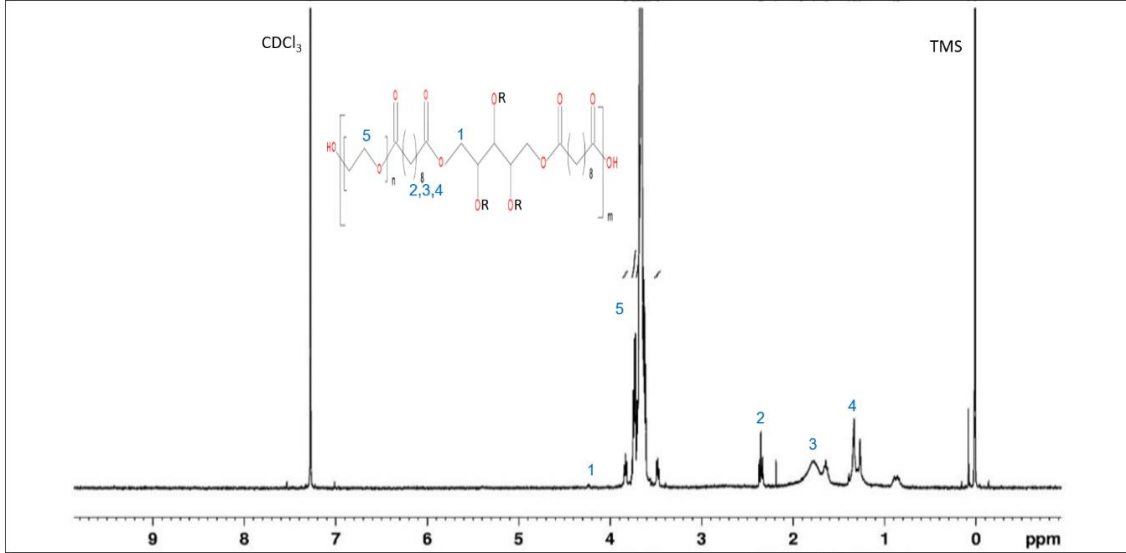
Farklı molekül ağırlığında PEG (550, 1500, 2000, 4000 ve 6000 g/mol) kullanılarak sentezlenen PXS-ko-PEG (PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>4</sub>, PXS-PEG<sub>5</sub>, PXS-PEG<sub>6</sub> ve PXS-PEG<sub>7</sub>) yapılarının CH<sub>2</sub>/OH oranları sırasıyla 0.92, 0.61, 0.84, 3.44 ve 6.36 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu veriler, artan PEG molekül ağırlığının CH<sub>2</sub>/OH oranındaki artışla doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi ise, artan PEG molekül ağırlığının esterifikasyon derecesinde meydana getirdiği azalmayla açıklanmaktadır.

Çizelge 4.3. PXS ve PXS-ko-PEG polimerlerinin –CH<sub>2</sub> ve –OH gruplarının FT-IR piklerinin alan değerlerinin integrasyon oranları.

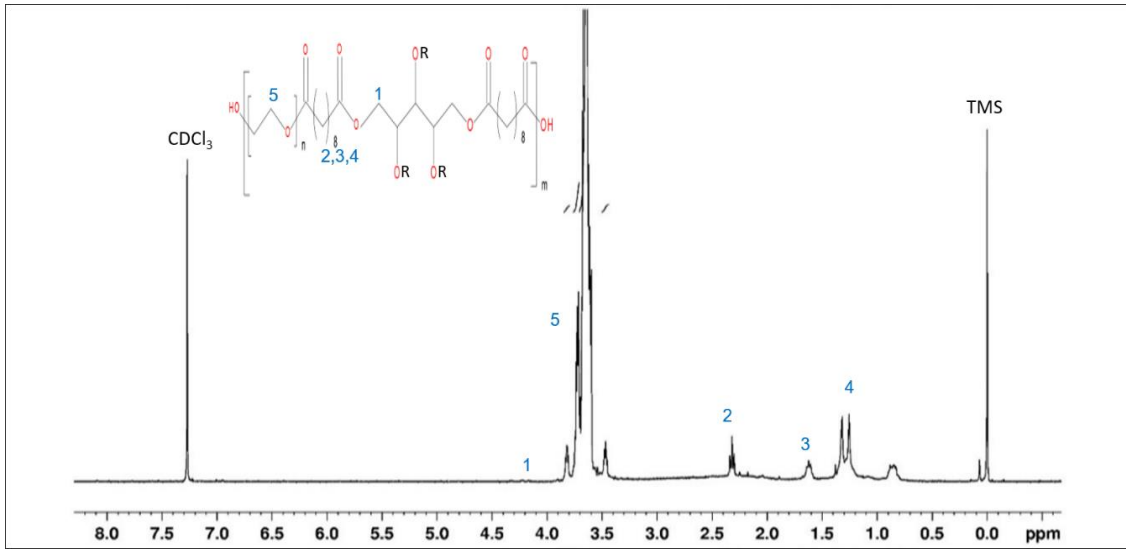
Örnek	CH <sub>2</sub> (2800-3000 cm <sup>-1</sup> )	OH (3150-3600 cm <sup>-1</sup> )	Oran(CH <sub>2</sub> /OH)
<b>PXS</b>	1700	4168	0.41
<b>PXS-PEG<sub>1</sub></b>	2514	2740	0.92
<b>PXS-PEG<sub>2</sub></b>	2644	1513	1.75
<b>PXS-PEG<sub>3</sub></b>	3099	1054	2.94
<b>PXS-PEG<sub>4</sub></b>	2043	3325	0.61
<b>PXS-PEG<sub>5</sub></b>	2075	2475	0.84
<b>PXS-PEG<sub>6</sub></b>	2761	802	3.44
<b>PXS-PEG<sub>7</sub></b>	2914	458	6.36

PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>2</sub>, PXS-PEG<sub>3</sub>, PXS-PEG<sub>4</sub>, PXS-PEG<sub>5</sub>, PXS-PEG<sub>6</sub> ve PXS-PEG<sub>7</sub> polimer yapılarının <sup>1</sup>H-NMR spektrumları Şekil 4.23-4.29'da verilmiştir. Polietilen glikol yapısındaki metilen grubu δ:3.60- 3.80 ppm'de şiddetli metilen piki ile tayin edilmiştir. Sebasik asit metilen pikleri δ:1.25, 1.35, 1.60 ve 2.35 ppm'de, ksilitolden kaynaklı metilen pikleri ise; δ:4.1- 4.25 ppm pikleri ile tayin edilmiştir. Ksilitol kaynaklı metilen piklerinin düşük şiddete sahip olması polietilen glikol molekülünden gelen metilen gruplarının yüksek

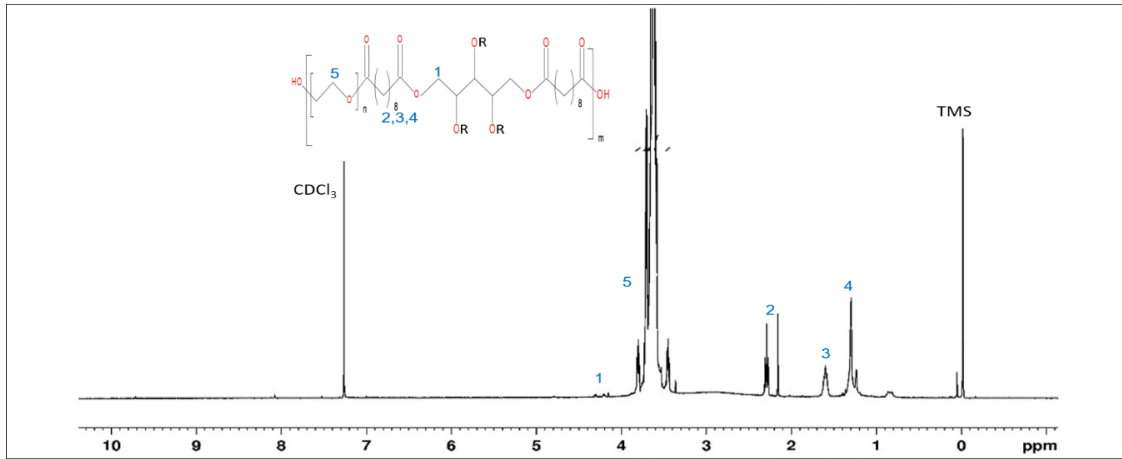
şiddetine bağlı olarak tekil –OH uç gruplarının düşük şiddete sahip olması ile açıklanmaktadır. Polietilen glikol yapılarındaki kalabalık metilen grupları ise,  $\delta$ :3.60- 3.80 ppm’de gözlenen şiddetli metilen piki ile karakterize edilmiştir.



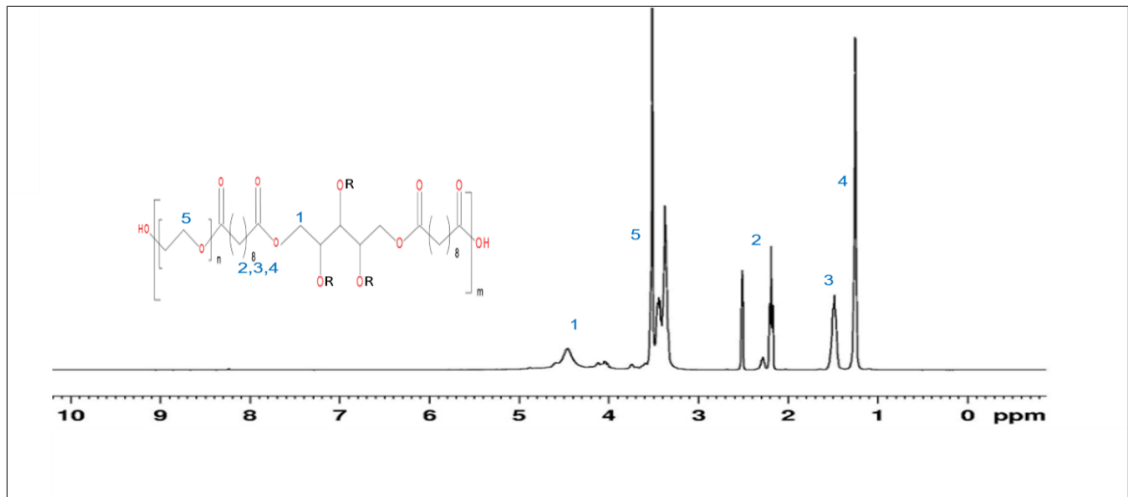
Şekil 4.23. PXS-PEG<sub>1</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.



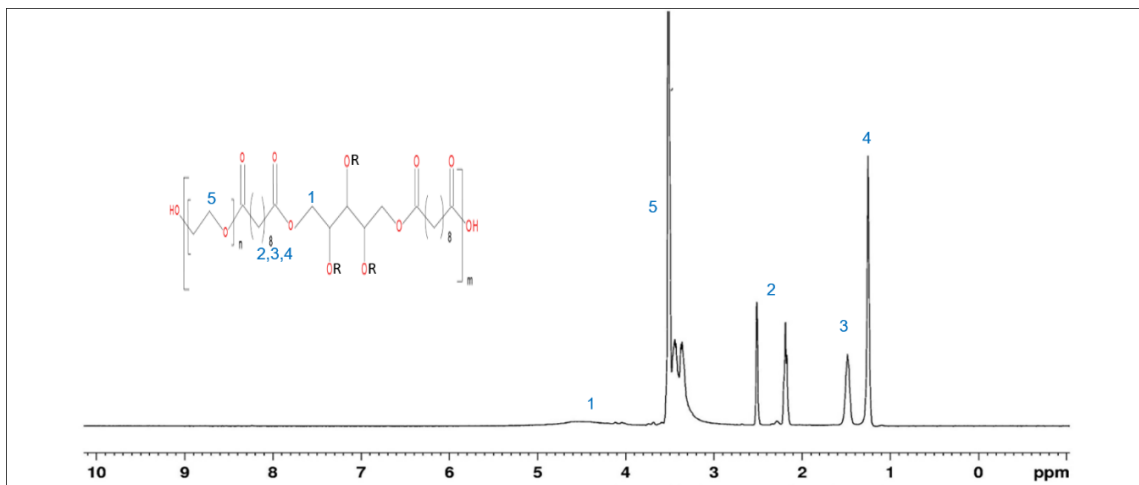
Şekil 4.24. PXS-PEG<sub>2</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.



Şekil 4.25. PXS-PEG<sub>3</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

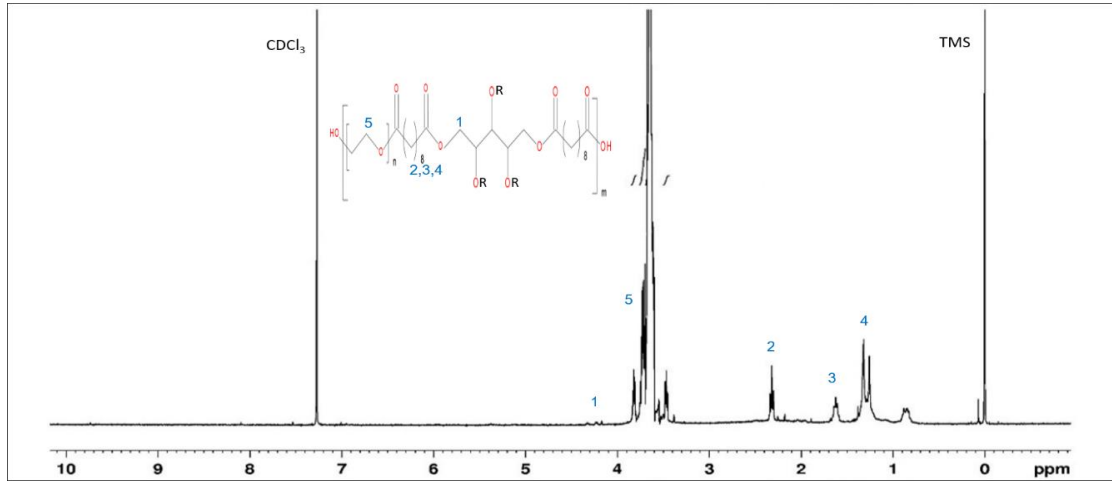


Şekil 4.26. PXS-PEG<sub>4</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

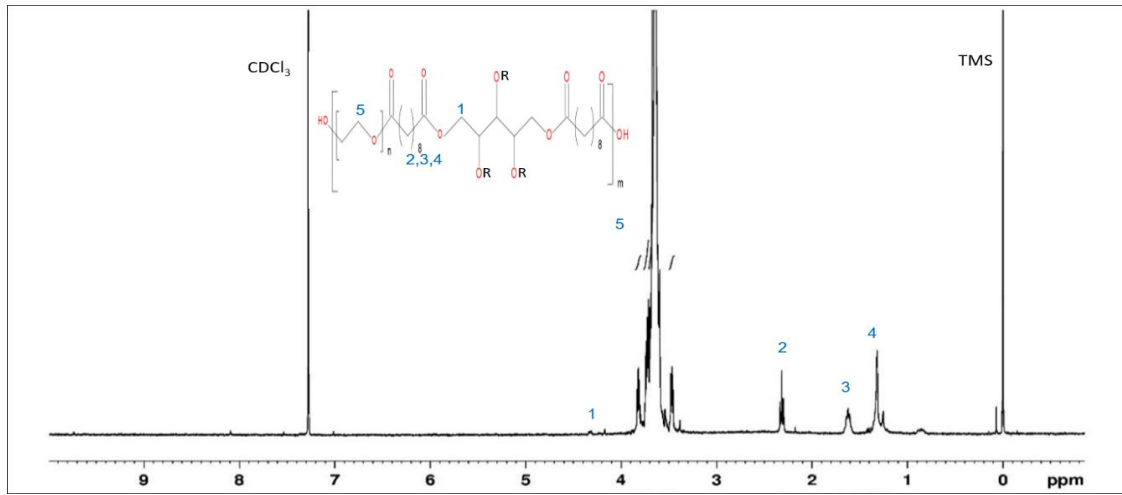


Şekil 4.27. PXS-PEG<sub>5</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.





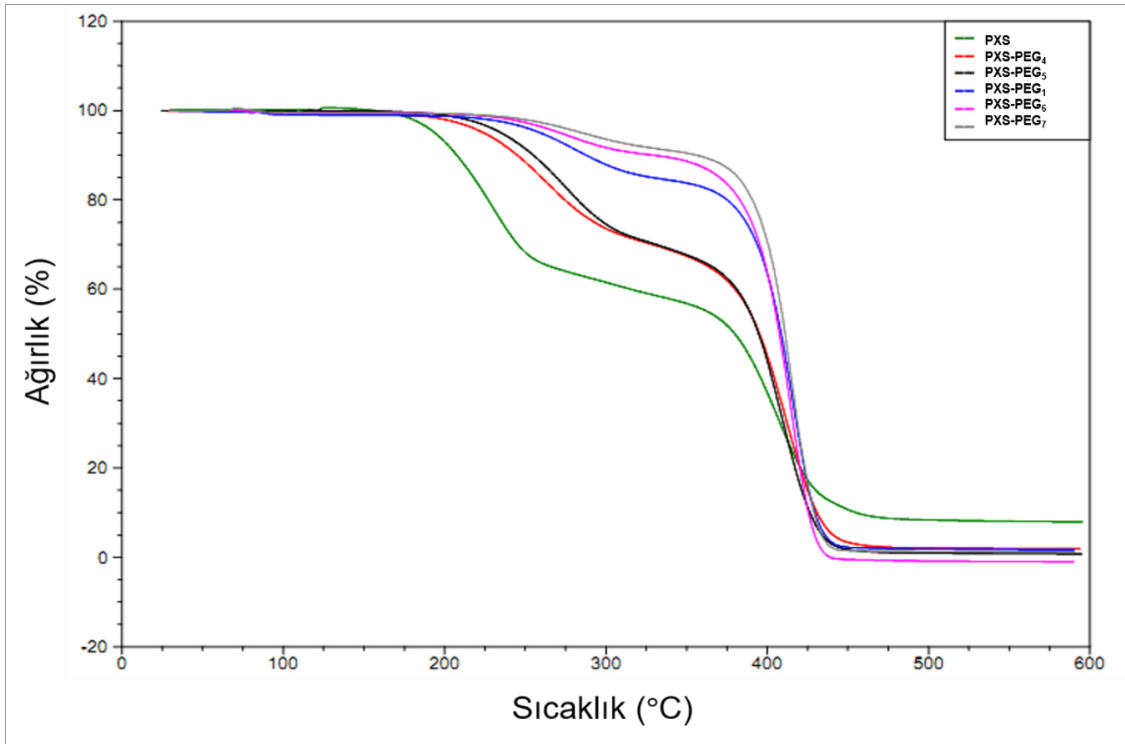
Şekil 4.28. PXS-PEG<sub>6</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.



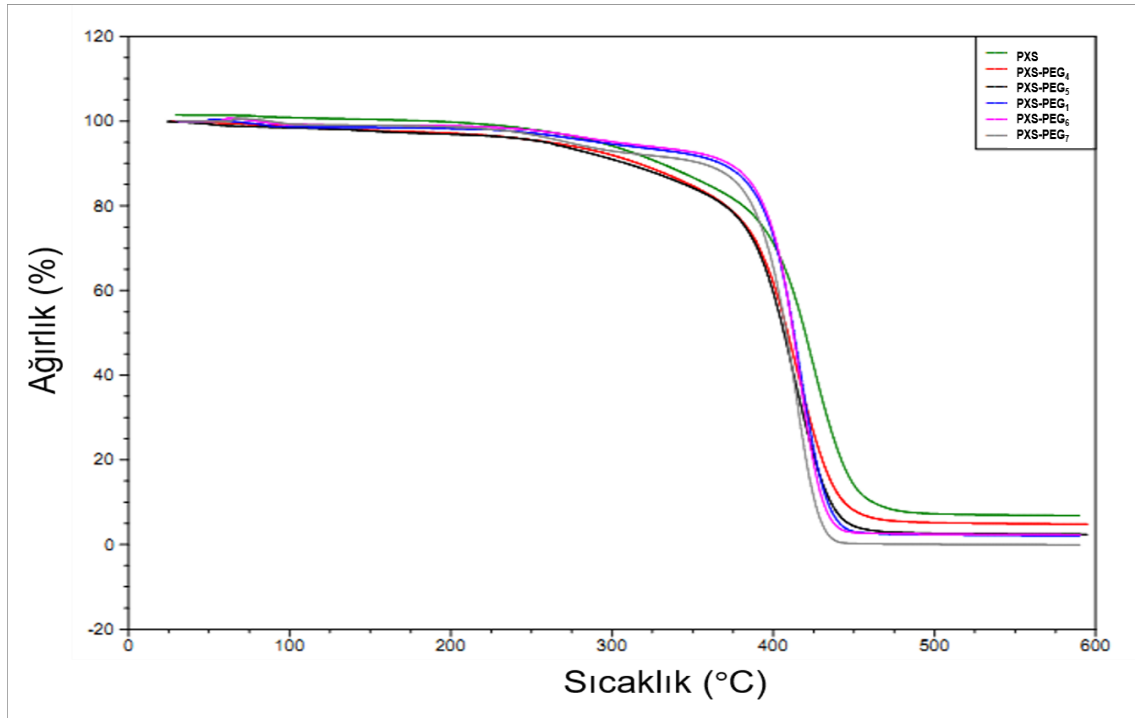
Şekil 4.29. PXS-PEG<sub>7</sub> ön polimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

PXS-ko-PEG ön polimer ve polimer yapılarının termal gravimetrik analizlerinin sonucunda da PGS-ko-PEG polimer yapılarında elde edilen sonuçlara benzer termal bozunma karakterleri gözlenmiştir. Ön polimer yapıları iki basamakta ısıl degradasyona uğrarken, polimerlerin çapraz bağlanması sonucunda elde edilen polimer yapılarının daha yüksek sıcaklıkta ve kararlılıkta tek basamakta bozunmaya uğradığı tayin edilmiştir. PXS-PEG<sub>7</sub> polimer yapısı ise düşük esterifikasyon derecesine bağlı olarak iki basamakta ön polimerine yakın termal bozunma profili sergilemiştir.

PXS-PEG<sub>1</sub> ön polimer yapısındaki termal bozunma ilk basamakta yaklaşık 230 °C'de başlarken, ikinci bozunma yaklaşık 400 °C'de gözlemlenmiştir. PXS-PEG<sub>4</sub> ön polimeri termal bozunmaya yaklaşık 180 °C'de başlayıp, ikinci bozunma sıcaklığı 400°C'de tespit edilmiştir. PXS-PEG<sub>5</sub> ön polimeri 220 °C'de, PXS-PEG<sub>6</sub> ön polimeri 250 °C'de ve PXS-PEG<sub>7</sub> ön polimeri 255 °C'de ilk basamak termal bozunma noktalarına sahiptir. PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>4</sub> ve PXS-PEG<sub>5</sub> polimerleri yaklaşık 400 °C'de tek basamakta ısıl bozunma değerine sahipken, PXS-PEG<sub>6</sub> yaklaşık 390 °C'de ve PXS-PEG<sub>7</sub> ise yaklaşık 375 °C'de termal degradasyona uğramıştır. Elde edilen veriler düşük molekül ağırlıklı PEG kullanılan polimerlerin termogramlarına benzer şekilde ön polimer yapılarının daha düşük sıcaklıkta iki basamakta termal bozunma gerçekleşirken çapraz bağlanma sonrası daha kararlı ve yüksek sıcaklıkta tek basamaklı bozunma gerçekleştirdiğini göstermektedir (Şekil 4.30, Şekil 4.31).



Şekil 4.30. PXS, PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>4</sub>, PXS-PEG<sub>5</sub>, PXS-PEG<sub>6</sub> ve PXS-PEG<sub>7</sub> ön polimerlerinin TGA termogramları.



Şekil 4.31. PXS, PXS-PEG<sub>1</sub>, PXS-PEG<sub>4</sub>, PXS-PEG<sub>5</sub>, PXS-PEG<sub>6</sub> ve PXS-PEG<sub>7</sub> polimerlerinin TGA termogramları.

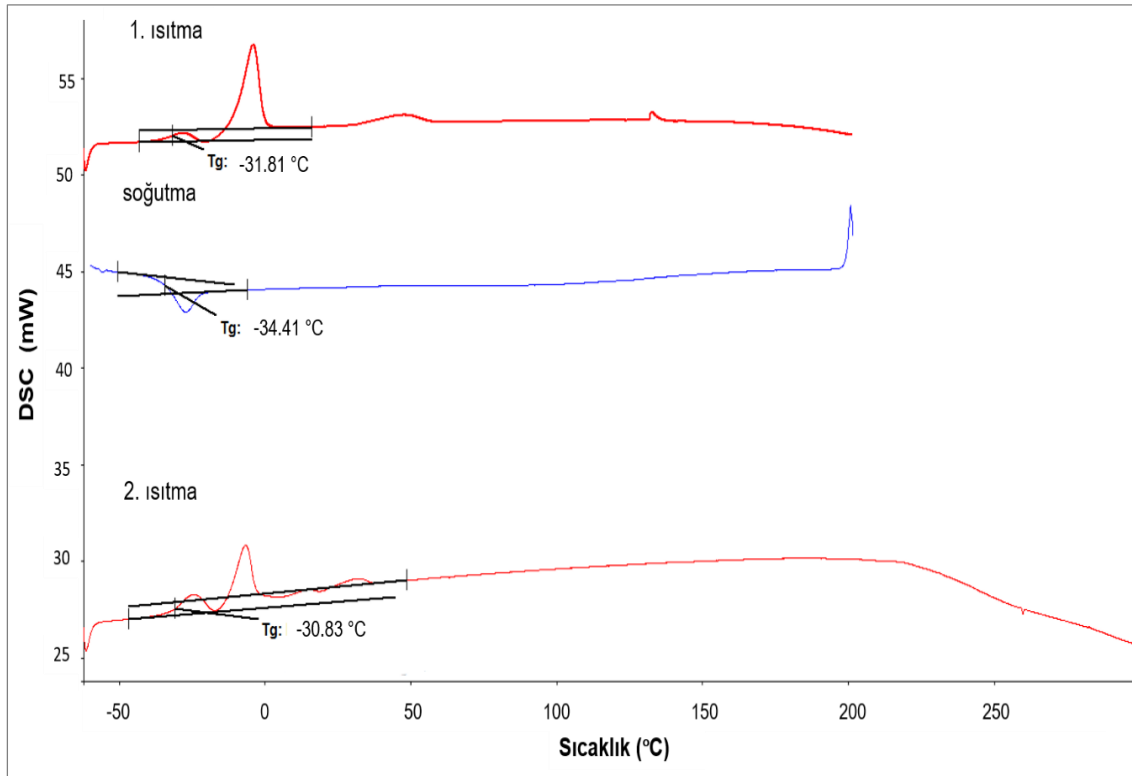
Çizelge 4.4'de sentezlenen tüm PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimerlerinin çapraz bağlanma sürelerine bağlı olarak fiziksel formları listelenmiştir. Çapraz bağlanma süresi olarak sırasıyla 6, 12, 24, 48 ve 72 sa denenmiştir. PGS ve PGS-*ko*-PEG polimerleri 48 sa kürleme süresinde elastomer formda olması nedeniyle bu kürleme süresinin kullanılmasına karar verilmiştir. PXS ve PXS-*ko*-PEG polimerleri için ise 72 sa kürleme süresi kullanılmasına karar verilmiştir. PXS'in 72 sa üzerindeki çapraz bağlama süresi sonunda elastomer formda olması sebebiyle kürleme süresi 72 sa seçilmiştir. 72 sa kürleme süresinde en yüksek esterifikasyon derecesine sahip olması sebebi ile PXS-*ko*-PEG polimerlerinin türevlerinden PXS-PEG<sub>4</sub> seçilmiştir. PGS-PEG<sub>4</sub> ve PXS-PEG<sub>4</sub> polimer yapıları Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verilen CH<sub>2</sub>/OH oranları incelendiğinde diğer PEG ile türevlendirilmiş polimerler arasından en yüksek hidroksil oranlarına sahip olduklarından esterifikasyonları daha kolay gerçekleşmiş olup, fiber üretimi için daha uygun oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle ileri çalışmalar için PGS, PGS-PEG<sub>4</sub>, PXS ve PXS-PEG<sub>4</sub> polimerleri seçilerek bu polimerler sadece PGS, PGS-*ko*-PEG, PXS ve PXS-*ko*-PEG olarak adlandırılacaktır.

Çizelge 4.4. Çapraz bağlanma süresinin polimerlerin fiziksel formlarına etkisi.

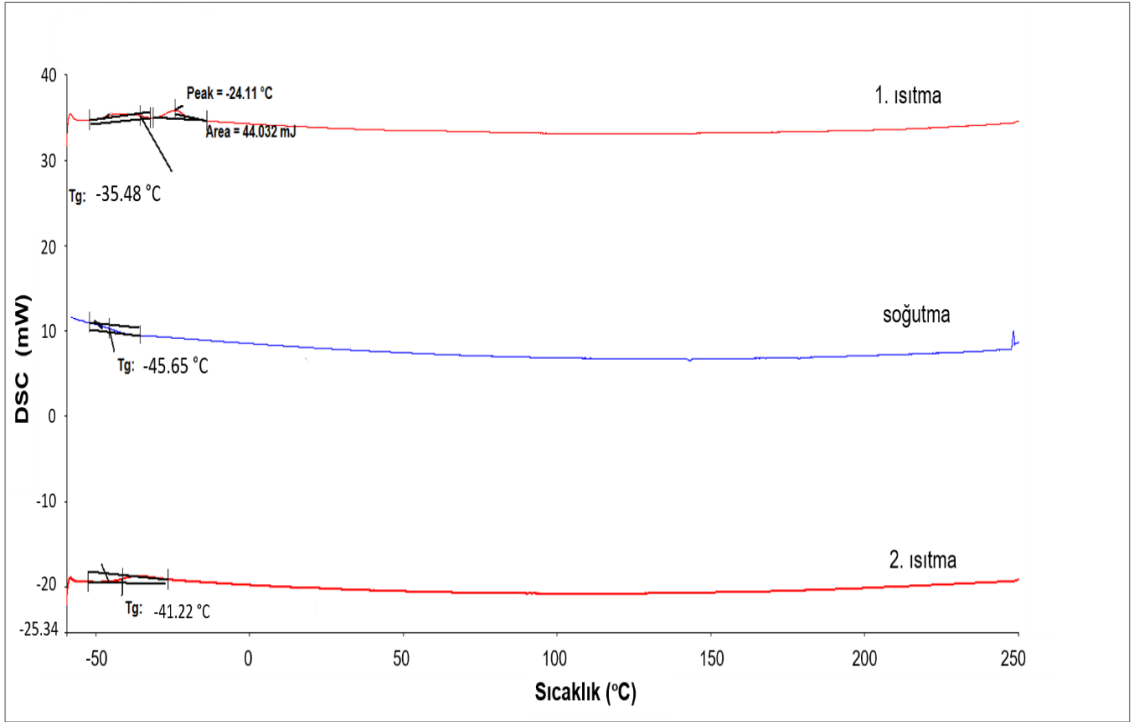
Polimer	6 saat	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat
<b>PGS</b>	Kırılğan balmumu	Balmumu	Yumuşak elastomer	<b>Elastomer</b>	-
<b>PGS-PEG<sub>1</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Viskoz sıvı	Viskoz sıvı
<b>PGS-PEG<sub>2</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Viskoz sıvı	Viskoz sıvı
<b>PGS-PEG<sub>3</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Viskoz sıvı	Viskoz sıvı
<b>PGS-PEG<sub>4</sub></b>	Kırılğan balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı	<b>Elastomer</b>	-
<b>PGS-PEG<sub>5</sub></b>	Kırılğan balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı	Viskoz sıvı	Viskoz sıvı
<b>PGS-PEG<sub>6</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Viskoz sıvı	Viskoz sıvı
<b>PGS-PEG<sub>7</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Viskoz sıvı	Viskoz sıvı
<b>PXS</b>	Kırılğan balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı	Yapışkan elastomer	<b>Elastomer</b>
<b>PXS-PEG<sub>1</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı
<b>PXS-PEG<sub>2</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı
<b>PXS-PEG<sub>3</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı
<b>PXS-PEG<sub>4</sub></b>	Kırılğan balmumu	Balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı	<b>Elastomer</b>
<b>PXS-PEG<sub>5</sub></b>	Kırılğan balmumu	Balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı	Viskoz sıvı
<b>PXS-PEG<sub>6</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı
<b>PXS-PEG<sub>7</sub></b>	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Kırılğan balmumu	Balmumu	Viskoz sıvı

PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerinin termal özellikleri DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.32’de PGS-ko-PEG polimerine ait DSC termogramı verilmiştir. PGS-ko-PEG polimerine ait camsı geçiş sıcaklığı 1. ısıtmada -31.81 °C’de tayin edilmiştir. 2. ısıtmada ise -30.83 °C olarak bulunmuştur. PXS-ko-PEG polimerlerine ait DSC termogramı ise Şekil 4.33’de verilmiştir. 1. ısıtmada

-35.48 °C olarak belirlenen camsı geçiş sıcaklığı, 2. ısıtmada -41.22 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca, her iki termogramda farklı şiddetlerde ~20 °C civarında belirlenen pik, polimerlerin yapısına katılan PEG molekülünden kaynaklanmaktadır. PXS-ko-PEG polimerinin yapısından kaynaklanan uzun zincirler, esnek yapı ve serbest hacmin artmasına bağlı olarak camsı geçiş sıcaklığı PGS-ko-PEG polimerine kıyasla daha düşük sıcaklıkta tayin edilmiştir. Oda koşullarının ve fizyolojik ortam koşullarının altında tayin edilen camsı geçiş sıcaklıkları, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerinin potansiyel biyomalzeme ve doku mühendisliği uygulamaları için uygun termal özelliklere sahip olduğunu desteklemektedir.



Şekil 4.32. PGS-ko-PEG polimerinin DSC termogramları.

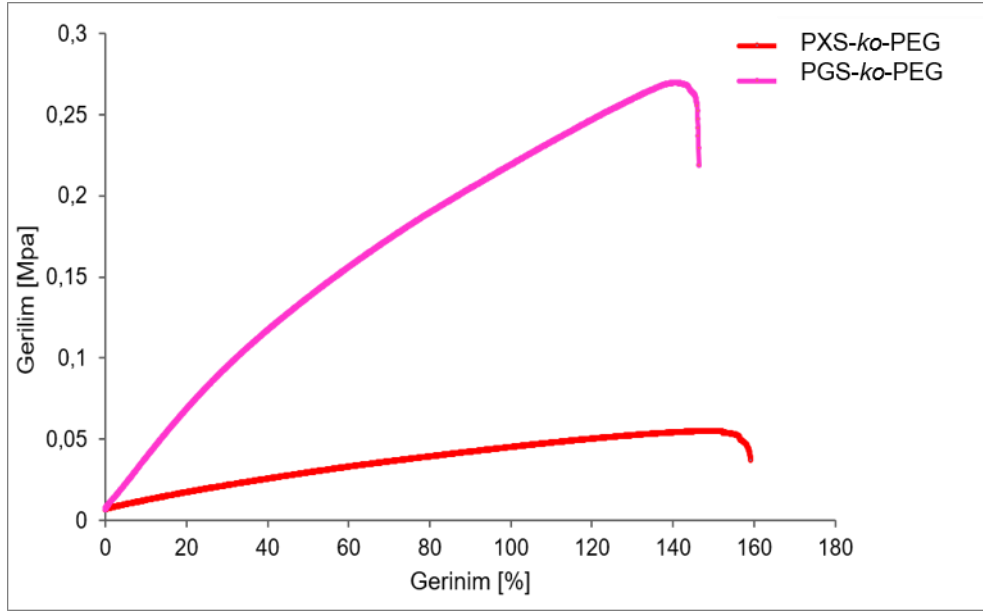


Şekil 4.33. PXS-ko-PEG polimerinin DSC termogramları.

PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerine ait gerilim-gerinim eğrileri Şekil 4.34'de sunulmuştur. PGS-ko-PEG polimerinin Young's modülüs değeri  $0.31 \pm 0.01$  olarak bulunmuştur. Ayrıca PGS-ko-PEG polimeri 10 mm/dk çekme hızında, maksimum ~%150 uzama sağlamıştır. PGS monomer mol oranları, kütleme sıcaklığı ve kütleme süresi değiştirilerek mekanik özellikleri geniş bir alana yayılan elastomer yapıda bir polimerdir. PGS polimerine sentez sırasında PEG moleküllerinin eklenmesi ile PGS-ko-PEG polimerlerinin elastomerik davranışlarında artış görüldüğü literatürde bildirilmiştir [158]. Sentezlenen PGS ve PGS-ko-PEG elastomerleri karşılaştırıldığında, uzama miktarı ve Young's modülüs değerlerindeki artış bu veriyi destekler niteliktedir.

PXS-ko-PEG polimerinin Young's modülüs değeri  $0.060 \pm 0.004$  olarak hesaplanırken maksimum uzama miktarı ~%160 olarak bulunmuştur. Yapıya eklenen PEG'in etkisiyle polimer zincir uzunluğunun artmasından dolayı % uzamada, PXS ve PGS'ye göre artış göstermiştir. PXS ve PGS-ko-PEG ile karşılaştırıldığında, ksilitolün varlığı ise Young's modülüs değerinin düşmesine ve % uzama değerinin artmasına neden olmuştur. PXS-ko-PEG polimerinin

literatürde kullanılan PGS ve PGS-*ko*-PEG polimerlerinin elastik modülüs ve uzama verilerine benzerlik göstermiştir [33]. Ayrıca Şekil 4.34'de karşılaştırmalı olarak belirtilen PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimerlerinin uzama miktarları arasındaki ilişki PGS ve PXS polimerlerinin uzama miktarları arasındaki ilişki ile benzerlik göstermektedir.

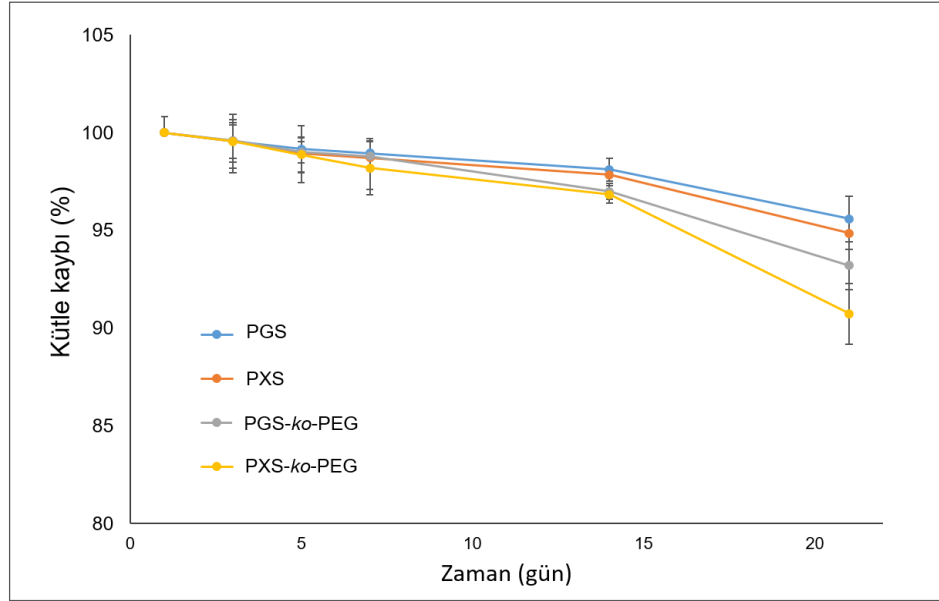


Şekil 4.34. PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimerlerinin gerilim-gerinim eğrileri.

#### 4.1.5. Poli(poliol) Sebakat ve Türevlerinin Hidrolitik Bozunma Davranışları

PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimer gruplarının hidrolitik bozunması 1, 3, 5, 7, 14 ve 21. günlerin sonunda PBS ortamı uzaklaştırılarak gravimetrik olarak belirlenmiştir (Şekil 4.35). Elastomer yapılarının yüksek oranda çapraz bağlanma derecesine sahip olmasından dolayı 21. günün sonunda PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimerleri sırasıyla % 4,4, %5,1, %6,8 ve %9,3 oranlarında kütle kaybına uğramıştır. Elde edilen veriler literatürle uyumludur. Literatürde de belirtildiği gibi polimerler yüzey erozyonuna uğrayarak oldukça yavaş şekilde bozunmaktadır [165, 168]. Şekil 4.35'de gösterildiği gibi hidrofilik PEG moleküllerinin yapıya katılması ile hidrolitik bozunma hızlanmıştır. Ayrıca ksilitolün gliserole kıyasla artan molekül ağırlığı ve daha düşük çapraz bağlanma yoğunluğuna sahip olması polimer zincirlerinin

arasına su moleküllerinin girmesini kolaylaştırdığı için bozunmayı hızlandırdığı görülmüştür.

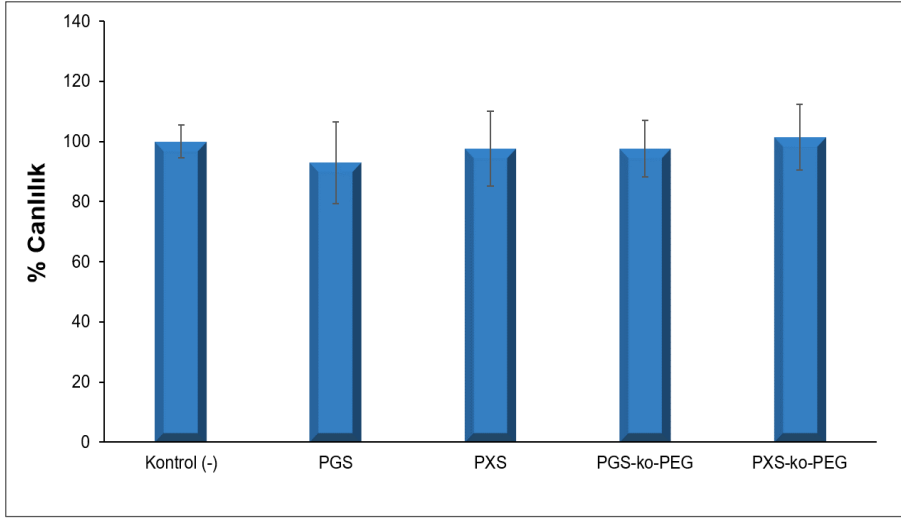


Şekil 4.35. PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG hidrolitik bozunma grafikleri.

#### 4.1.6. Poli(poliol) Sebakat ve Türevlerinin Hücre Canlılığına Etkisi

Sentezlenen polimer yapıları potansiyel biyomalzeme ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere ISO 10993-5 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi – Bölüm 5: *in vitro* sitotoksite testleri ” standartının “Endirekt MTT sitotoksite testi” kapsamında sitotoksite testi uygulanmıştır. Deneysel çalışmalarda L929 hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin pozitif kontrol grubu dışında yüksek oranda canlılığını koruduğu morfolojik ve hücre canlılığı verileri ile doğrulanmıştır. Şekil 4.36’da PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimer grupları için gerçekleştirilen zamana bağlı indirek sitotoksite testinin sonuçları gösterilmektedir.





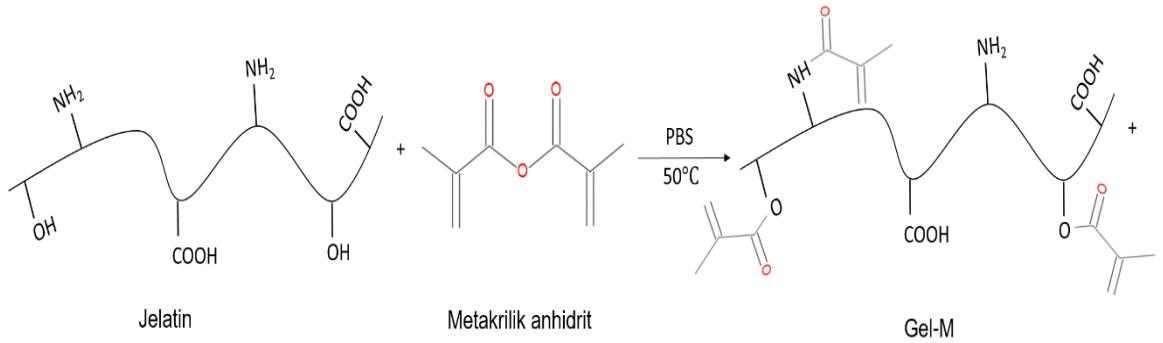
Şekil 4.36. PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerinin L929 fibroblast hücre hattı ile gerçekleştirilen MTT test sonuçları.

Sitotoksite testi standartına uygun olarak yapılan test sonuçlarına göre PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerleri L929 hücreleri üzerinde hiçbir toksik etki göstermemiştir. Tüm polimerlerin % 90 üzerinde canlılık değerine sahip olduğu izlenmiştir. Literatürde de belirtildiği üzere PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerleri biyomalzeme olarak kullanılmaya uygun bulunmuştur [33, 169]. Polimerlerin fabrikasyonu sonrasındaki hücre kültürü çalışmaları için yumuşak doku olarak deri dokusu hedeflendiği için ilerleyen hücre kültürü çalışmaları ATCC dermal fibroblast ve keratinosit hücreleri ile gerçekleştirilmiştir.

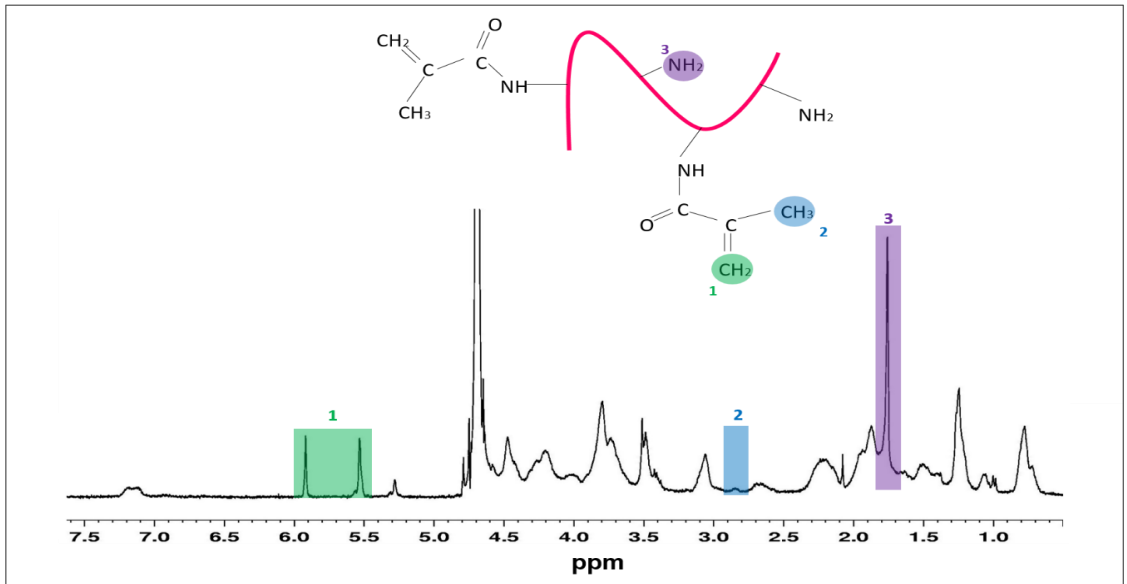
#### 4.2. Gelatin Metakrilat Hidrojellerin Özellikleri

Sentezlenen Gel-M, UV fotobaşlatıcı (irgacure) varlığında kürlendikten sonra hidrojel elde edilmiştir. Sentezlenen Gel-M 'nin molekül formülü Şekil 4.37'de ve NMR spektrumu Şekil 4.38'de verilmiştir. Gel-M yapısındaki gelen  $\delta$ : 5.5-5.9 ppm'de metilen (2H) grupları,  $\delta$ : 1.7-1.9 ppm'de metil (3H) grupları ve  $\delta$ : 2.8-2.9 ppm'de birincil amin grupları gösterilerek sentezin başarılı olduğu doğrulanmıştır [170]. Ayrıca sentezlenen Gel-M polimerinin metakrilatlanma derecesi Eşitlik 3.1'de belirtilen denklem kullanılarak lizin gruplarının sentez

öncesi ve sonrası  $^1\text{H-NMR}$  spektrumdaki integrasyon alan değerleri kullanılarak hesaplanmıştır [161]. Fenil alanin sinyali (6.9-7.5 ppm) normalizasyon için kullanılmıştır. Sentezlenen Gel-M polimerinin metakrilatlanma derecesi (MD) % 62 olarak hesaplanmıştır. MD kullanılan metakrilik anhidrit oranı ile doğrudan etkilenmektedir. Literatür verileri incelendiğinde, Nichol ve ark. % 0.25, % 1.25 ve % 20 metakrilik anhidrit (v/v) kullanarak gerçekleştirdikleri Gel-M sentezlerinde MD sırasıyla % 19.7, % 53.8 ve % 81.4 olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan Hoch ve ark. metakrilik anhidrit miktarını 2 ve 10 kat arttırarak % 85 ve % 100 metakrilatlanma derecesinde Gel-M sentezlemiştir [161].

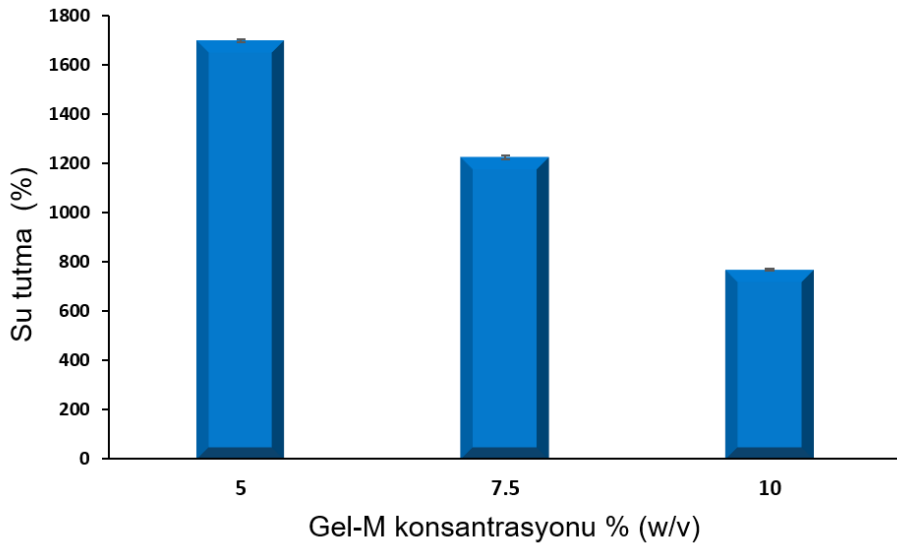


Şekil 4.37. Gel-M sentez reaksiyon şeması.



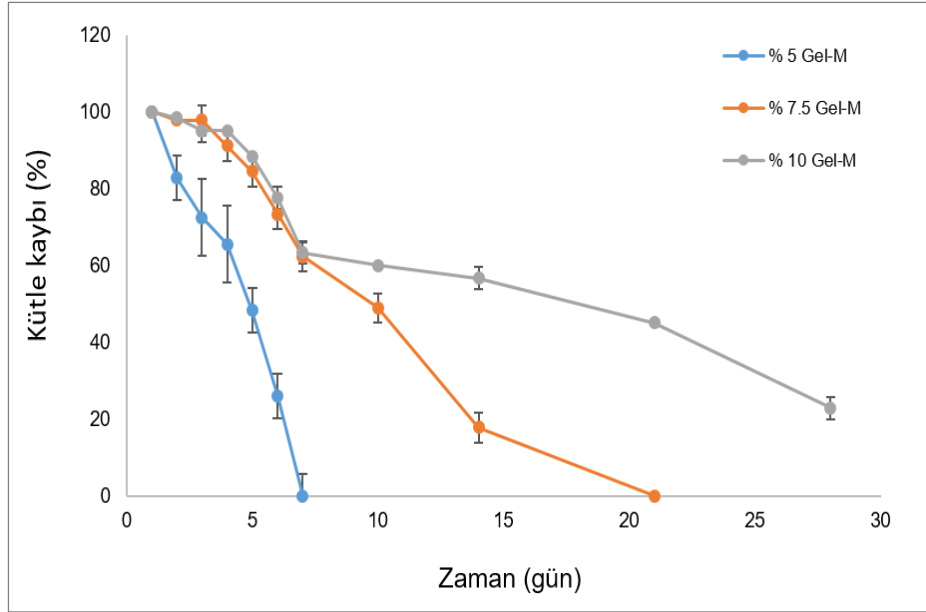
Şekil 4.38. Gel-M  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

Farklı konsantrasyonda (% 5, % 7.5 ve % 10 (w/v)) hazırlanan Gel-M çözeltileri ile UV kütleme işlemi sonrası farklı hidrojel yapıları elde edilmiştir. Elde edilen Gel-M hidrojellerin su tutma kapasitelerini belirlemek için hidrojeller 24 sa 5 mL PBS çözeltisi içerisinde bekletildikten sonra tartılmış ve kuru ağırlıkları ile oranlanarak % su tutma kapasiteleri belirlenmiştir (Şekil 4.39). % 5'lik Gel-M yüzde 1697  $\pm$ 6.2 oranında su tutma kapasitesine sahipken, % 7.5'lik Gel-M yüzde 1222  $\pm$ 8.5 ve % 10 Gel-M yüzde 768  $\pm$ 3.4 su tutma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça çapraz bağlanma oranı da artış gösterdiğinden su tutma kapasitesinde azalma gözlenmiştir.



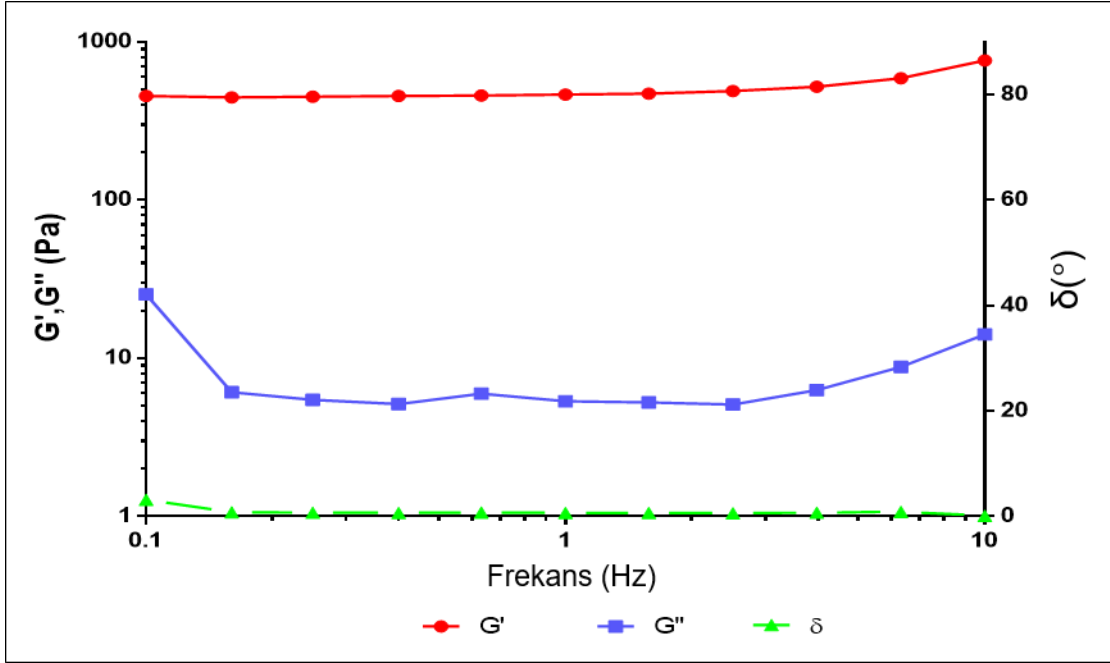
Şekil 4.39. Gel-M hidrojellerin yüzde su tutma kapasitesi.

Hazırlanan Gel-M hidrojellerinin hidrolitik bozunma incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.40'da sunulmuştur. % 5'lik Gel-M 7. günün sonunda, % 7.5'lik Gel-M ise 21. günün sonunda tamamen bozunmuştur. % 10'luk Gel-M hidrojel grubu ise 28. günün sonunda % 77 oranında hidrolitik bozunmaya uğramıştır. Gel-M konsantrasyonunun artmasıyla çapraz bağlanma oranı artmış olup, su molekülerinin polimer zincirlerinin arasına girmesi zorlaşarak, bozunma hızı yavaşlamıştır. Bu nedenle %10'luk Gel-M grubu diğerlerine nazaran daha yavaş bozunmaya uğramıştır. Elde edilen şişme ve hidrolitik bozunma sonuçlarının literatürde sunulan sonuçlar ile uyumlu olduğu gözlenmiştir [65].

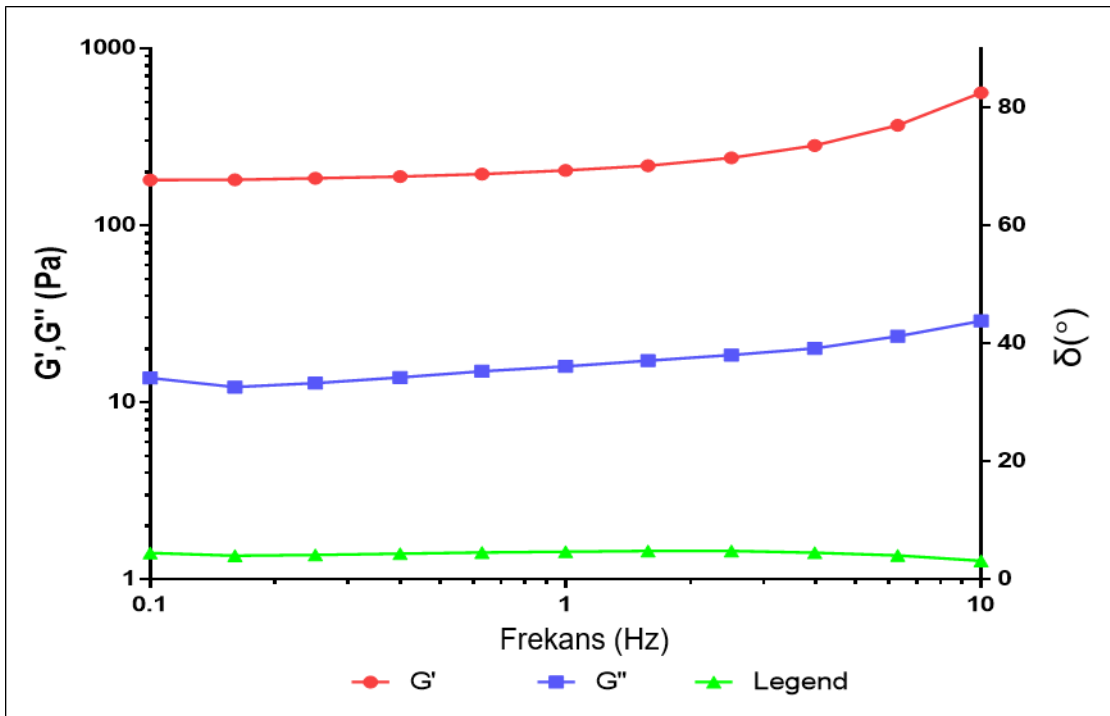


Şekil 4.40. Gel-M hidrojenlerin hidrolitik bozunma profilleri.

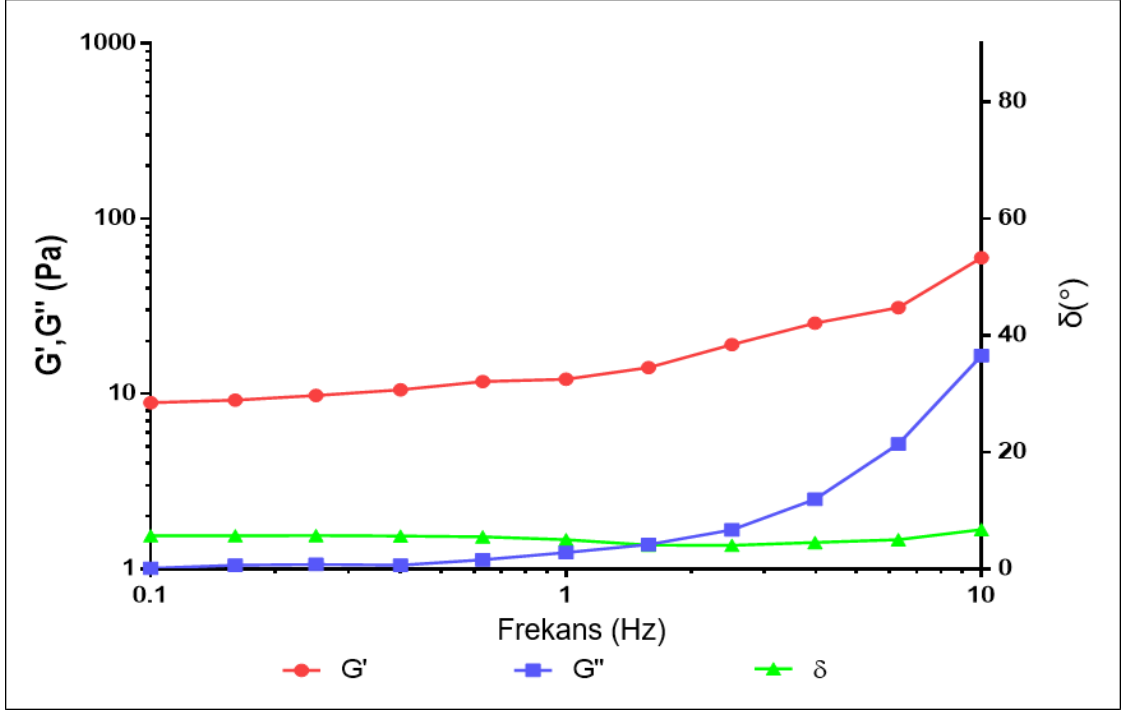
Hazırlanan %5, %7.5 ve %10'luk Gel-M hidrojenlerin viskoelastik özelliklerinin değerlendirilmesi için reolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Gel-M hidrojel örneklerine ait frekans taramaları incelendiğinde 0.1–10 Hz aralığında tüm örneklerde depolama modülüsünün kayıp modülüsten yüksek olduğu ( $G' > G''$ ) görülmüştür (Şekil 4.41- 4.43). Taranan frekans aralığında Gel-M yapılarının jel karakterinde oldukları izlenmekle birlikte, % 5'lik Gel-M hidrojel örneğinde taramanın sonuna doğru olan artış eğilimi ve faz açısındaki değişim malzemenin sıvı karakterinin diğer iki örneğe göre daha fazla olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.41. % 10'luk Gel-M hidrojin frekans taraması.

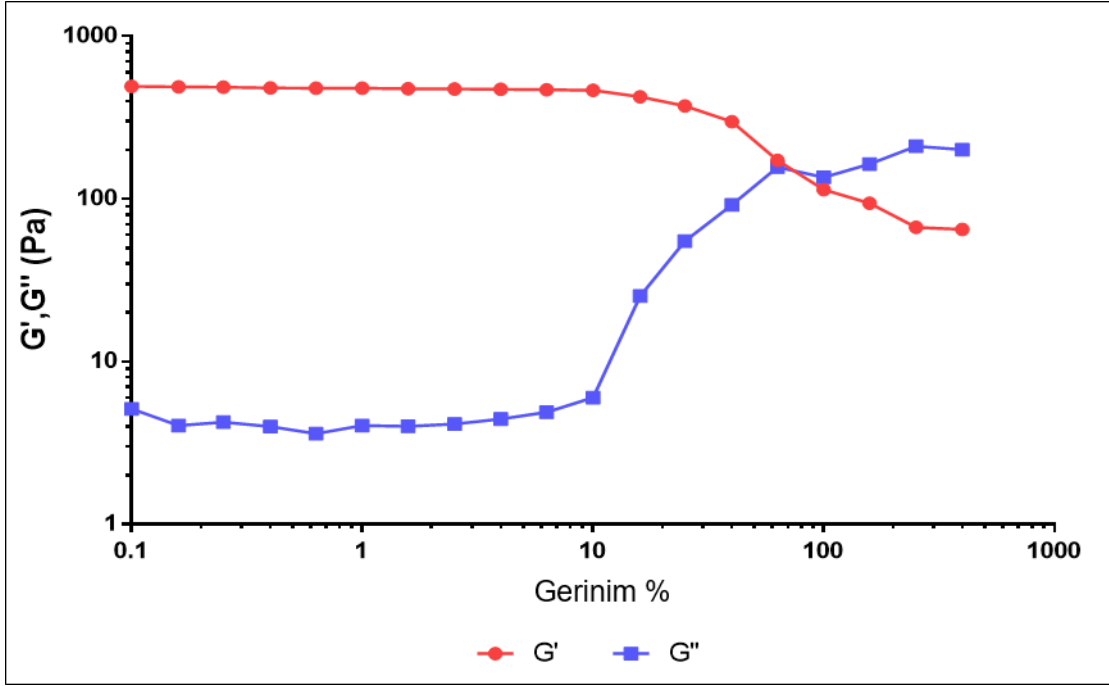


Şekil 4.42. % 7.5'luk Gel-M hidrojin frekans taraması.

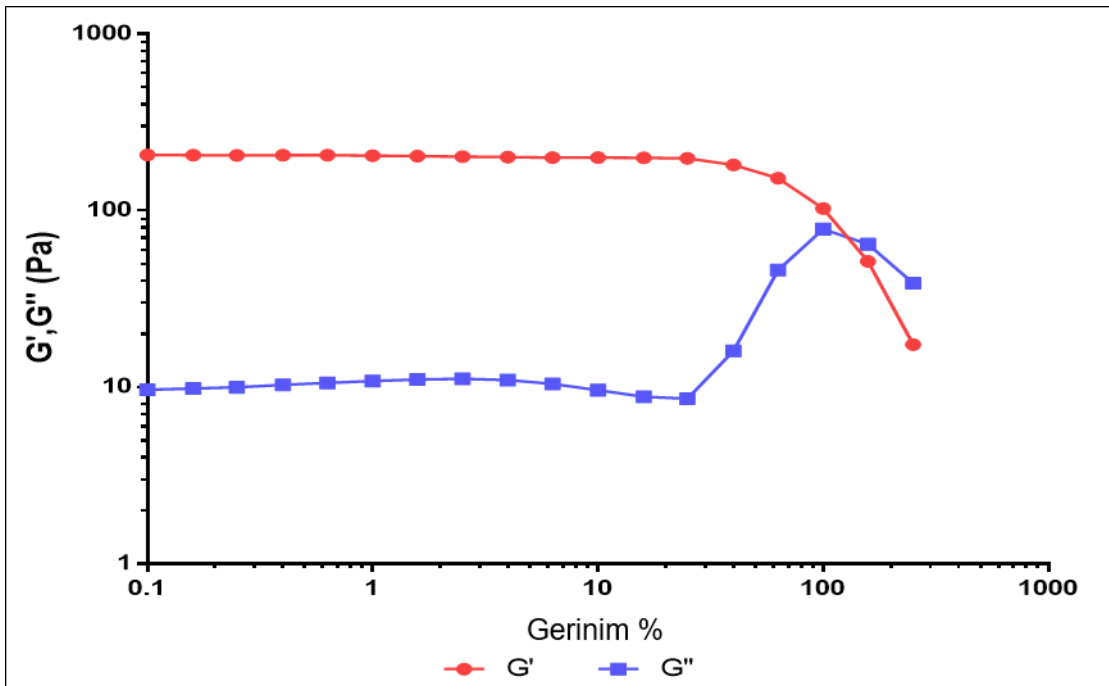


Şekil 4.43. % 5'lik Gel-M hidrojelinin frekans taraması.

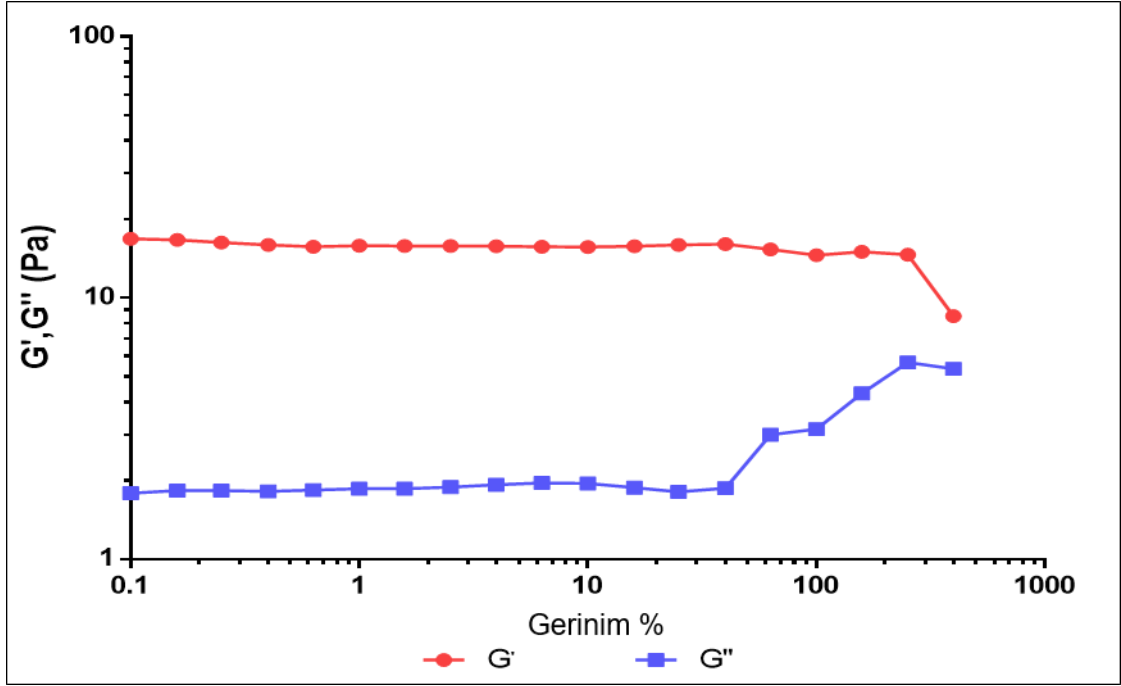
Gel-M örneklerinin 0.1–1000 % uzama aralığında ve 1 Hz sabit frekansta gerinim taramaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.44 - 4.46). Elastik modülüs değerlerinin birlikte verildiği Şekil 4.47 incelendiğinde tüm hidrojellerin %25 esnemeye kadar lineer viskoelastik bölgelere sahip oldukları ve bu bölgelerdeki  $G'$  değerlerinin gelatin konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Van Den Bulcke ve ark. tarafından yapılan çalışmanın sonuçları da gelatin metakrilat konsantrasyonu azaldıkça depolama modülüsünün doğru orantılı olarak azaldığını desteklemektedir [46]. Lineer bölgelerde en yüksek elastik modülüs değerine %10'luk Gel-M sahip olmakla birlikte, gerinime karşı bütünlüğünü ilk olarak % 10'luk Gel-M örnek grubu kaybetmektedir. Diğer taraftan, % 7.5 ve % 5'lik Gel-M örnek gruplarında lineer viskoelastik bölge sırasıyla % 80 ve % 250 olmakla beraber, % 5'lik Gel-M örneği için bu aralıkta hesaplanan 16 Pa depolama modülüs değeri ilerleyen hücre kültürü uygulamalarında kullanılmak için düşük olarak değerlendirilmiştir.



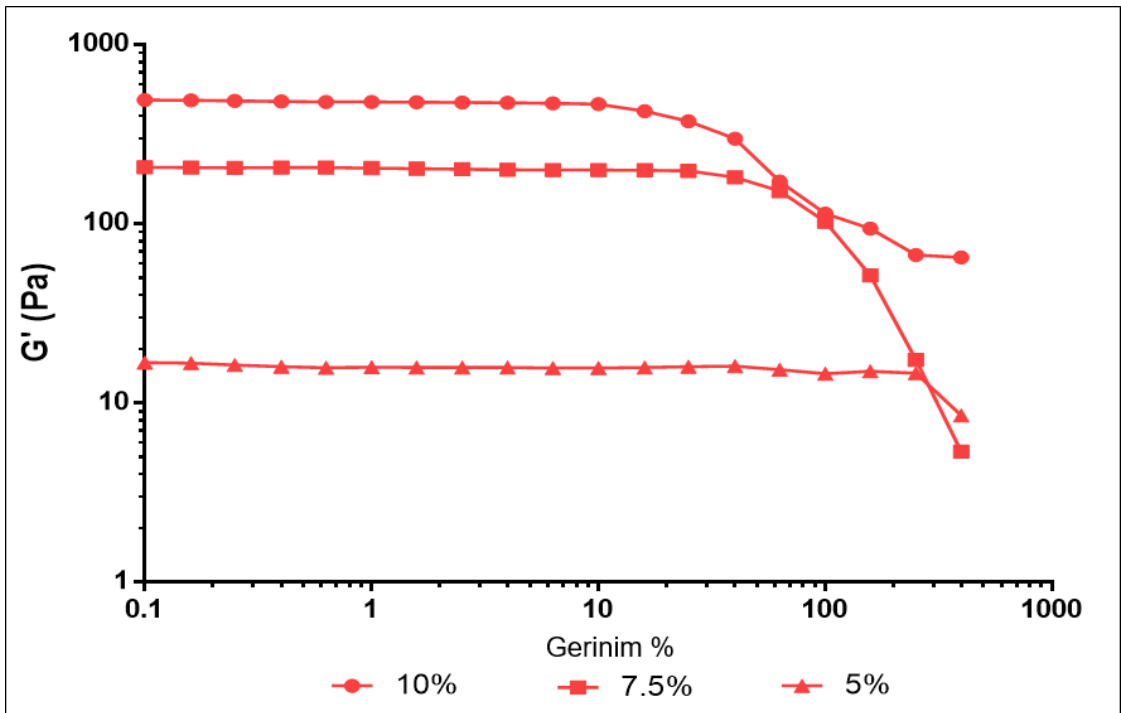
Şekil 4.44. % 10'luk Gel-M hidrojelinin % gerinim taraması.



Şekil 4.45. % 7.5'luk Gel-M hidrojelinin % gerinim taraması.



Şekil 4.46. % 5'lik Gel-M hidrojelinin % gerinim taraması.

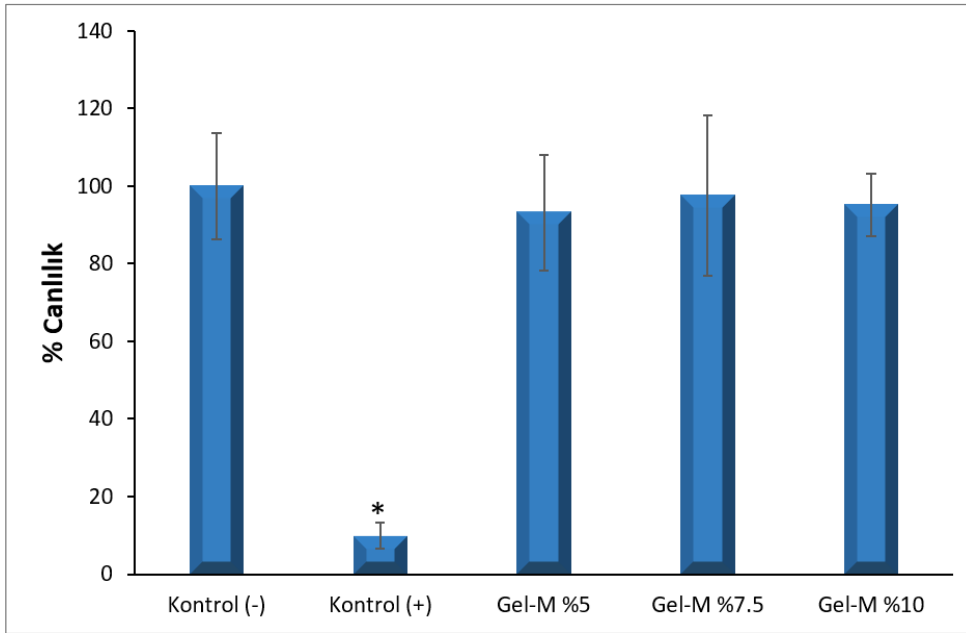


Şekil 4.47. Gel-M hidrojellerinin % gerinim taraması verilerinin karşılaştırılması.



Sentezlenen Gel-M hidrojel yapıları farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak şişme, degradasyon ve viskoelastik özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan hidrojellerin, fiber:hidrojel çift katmanlı doku iskelesi çalışmalarında fibroblast:keratinosit ko-kültüründe kullanılması hedeflendiği için fiberler ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında dermal fibroblast hücreleri kullanılırken, hidrojel çalışmaları keratinosit hücreleri ile gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığının belirlenmesi için in-direkt MTT testi gerçekleştirilmiştir. Gelatin metakrilat hidrojelleri literatürde birçok farklı hücre türüne karşı test edilmiştir ve ECM'i taklit edebilen biyouyumlu bir malzeme olduğu belirtilmiştir [171, 172]. Şekil 4.48'de belirtildiği üzere % 10, % 7.5 ve % 5'lik Gel-M hidrojel yapılarının tümü negatif kontrole yakın yaklaşık % 100 canlılık göstererek sitotoksik etkilerinin olmadığı kanıtlanmıştır.



Şekil 4.48. Gel-M hidrojellerin keratinosit hücreler ile gerçekleştirilen *in vitro* indirekt MTT test sonuçları. \*anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Poli(poliol)Sebakat Bazlı Fiberlerin Özellikleri

Poli(poliol)sebakat bazlı polimerler, ayarlanabilir mekanik özellikleri, biyobozunur ve biyouyumlu malzemeler olmalarından dolayı, biyomalzeme-doku mühendisliği uygulamaların kullanılmak için oldukça elverişli yapılardır. Sentezlenen PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimerleri ısı kütleme sıcaklığına ve süresine bağlı olarak farklı çapraz bağlanma yoğunluğu göstermektedir. Çapraz bağlanma yoğunluğu arttıkça mekanik dayanımı artarken çözünürlükleri ise azalmaktadır. Bu sınırlama malzemenin fabrikasyonunu ve biyomalzeme olarak kullanımını da güçleştirmektedir. Bu sebeple, yüksek çapraz bağlanma yoğunluğuna sahip PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimerleri termal çapraz bağlanma öncesinde yani ön polimer aşamasında fiber üretimi gerçekleştirilmiş ve daha sonra çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG ön polimer yapıları ortak çözücüde çözünen ve ısı kütleme işleminin yapıldığı 130 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda erime sıcaklığına sahip polimerlerle çözelti oluşturularak uygun viskozite değerinin elde edilmesiyle taşınabilir EHD ve basınçlı jirasyon teknikleri ile fiber yapıların elde edilmesi sağlanmıştır. Yapıya ısı kararlılık sağlayan polimer olarak PVA seçilmiştir. PVA polimeri, erime noktası 200 °C olması sebebiyle 130 °C'de rahatlıkla termal kararlılık sağlayabileceğinden dolayı seçilmiştir. Elde edilen yapılar ısı kütleme işlemi sonrası sırasıyla su ve etanol yıkamasından geçirilerek hidrofilik PVA polimerinin ve reaksiyona girmemiş PPS monomerlerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Böylelikle mikro/nano yapıda fiber formunda elastomer yapıların üretimi sağlanmıştır.

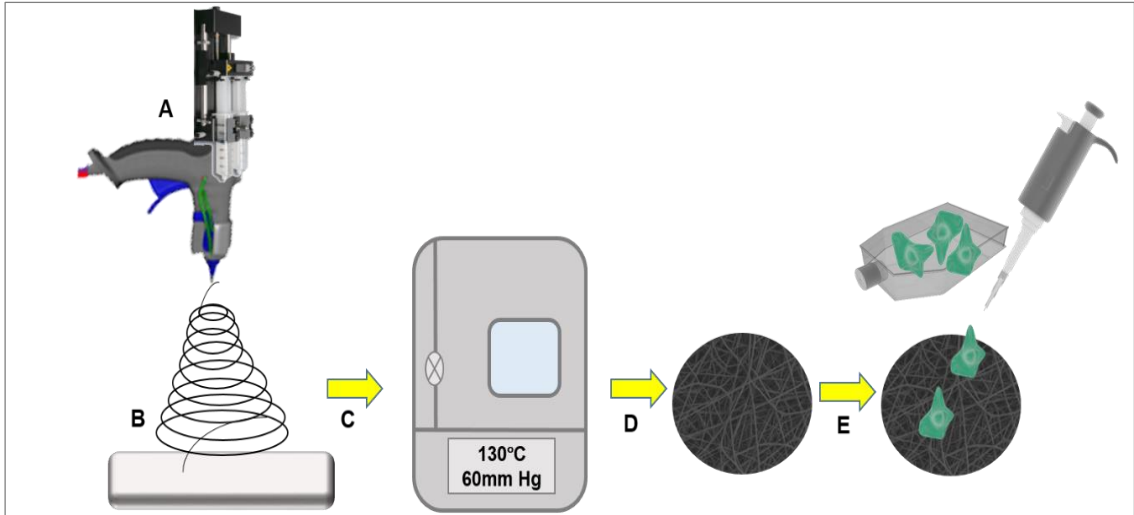
PGS, PGS-*ko*-PEG, PXS ve PXS-*ko*-PEG polimerlerinin PVA ile hazırlanan çözeltilerinin konsantrasyon, iletkenlik, viskozite ve yüzey gerilimi değerleri Çizelge 4.5'de detaylı olarak belirtilmiştir.

Çizelge 4.5. Fiber üretiminde kullanılan polimer çözeltilerin özellikleri.

Polimer Çözeltisi (45 :55 (w/w))	Konsantrasyon %	İletkenlik	Viskozite (mPa.s)	Yüzey Gerilimi (mN/m)
PGS : PVA	10	-	31.4±0.3	6.55±0.03
PGS : PVA	15	10.96±0.02	90.3±0.4	6.87±0.01
PXS : PVA	15	12.22±0.03	99.8±0.6	6.94±0.02
PGS-ko-PEG : PVA	15	34.30±0.01	86.9±0.6	7.03±0.01
PXS-ko-PEG : PVA	15	41.50±0.02	96.8±0.5	7.10±0.01

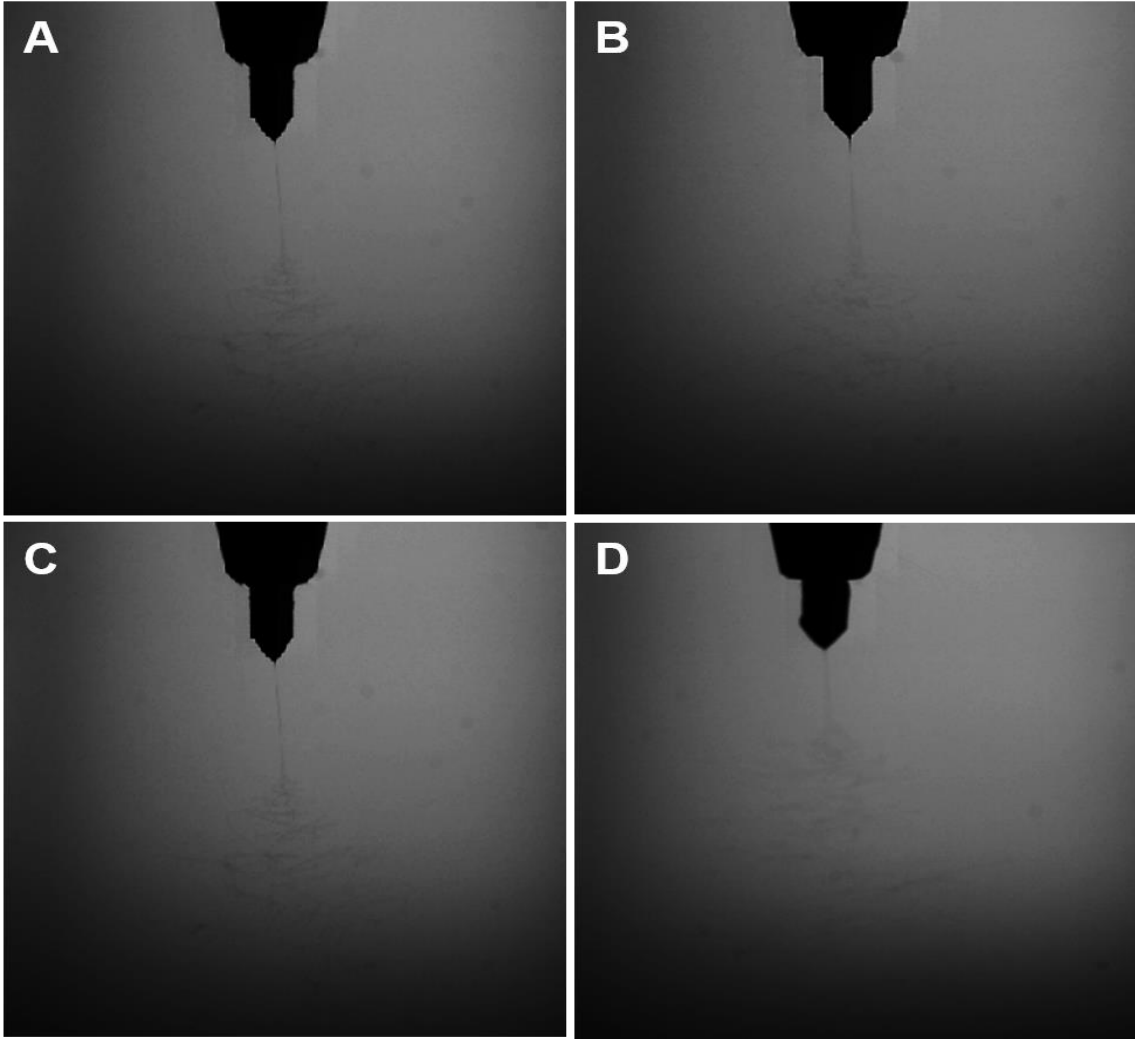
#### 4.3.1. Taşınabilir Elektro Hidrodinamik Sistem ile Elektro-Eğrilmiş Fiberler

Sentezlenen PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG ön polimerlerinin PVA ile hazırlanan karışım çözeltileri PPS:PVA 55:45 (w/w) oranında hazırlanmıştır. EHD taşınabilir tabanca düzeneğinde 18 G ekstrüzyon iğnesi kullanılarak 12, 24 ve 48 µL/dk akış hızlarında ve %15 (w/v) konsantrasyon değeri sabit tutularak, fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. EHD taşınabilir tabancada tek kanallı iğne kullanılmıştır. Fiber üretimi tabanca iğnesi ile toplayıcı yüzey arasında 13 cm mesafe sabit tutularak ve % 44.7±4 nem ve 22±3 °C sıcaklık koşullarında gerçekleştirilmiştir. Artan nem ve sıcaklığın jet oluşumunu bozduğu bildirilmiştir [107]. Taşınabilir EHD sistemi ile elektro-eğrilmiş fiber üretiminin şematik olarak Şekil 4.69'da gösterilmiştir. 12 µL/dk akış hızında fiber jeti sağlanamamış olup, 24 ve 48 µL/dk akış hızında fiber yapıları elde edilmiştir. Elde edilen fiberlerin morfolojileri PGS, PGS-ko-PEG, PXS ve PXS-ko-PEG polimerleri için Şekil 4.71-4.74'de gösterilmiştir.



Şekil 4.49. Taşınabilir EHD tabanca sistemi ile elektro-eğrilmüş fiberlerin üretiminin şematik gösterimi. A) taşınabilir EHD tabanca, B) fiber jet oluşumu, C) ısıl kütleme, D) PPS fiberlerin eldesi, E) hücre-malzeme etkileşimi.

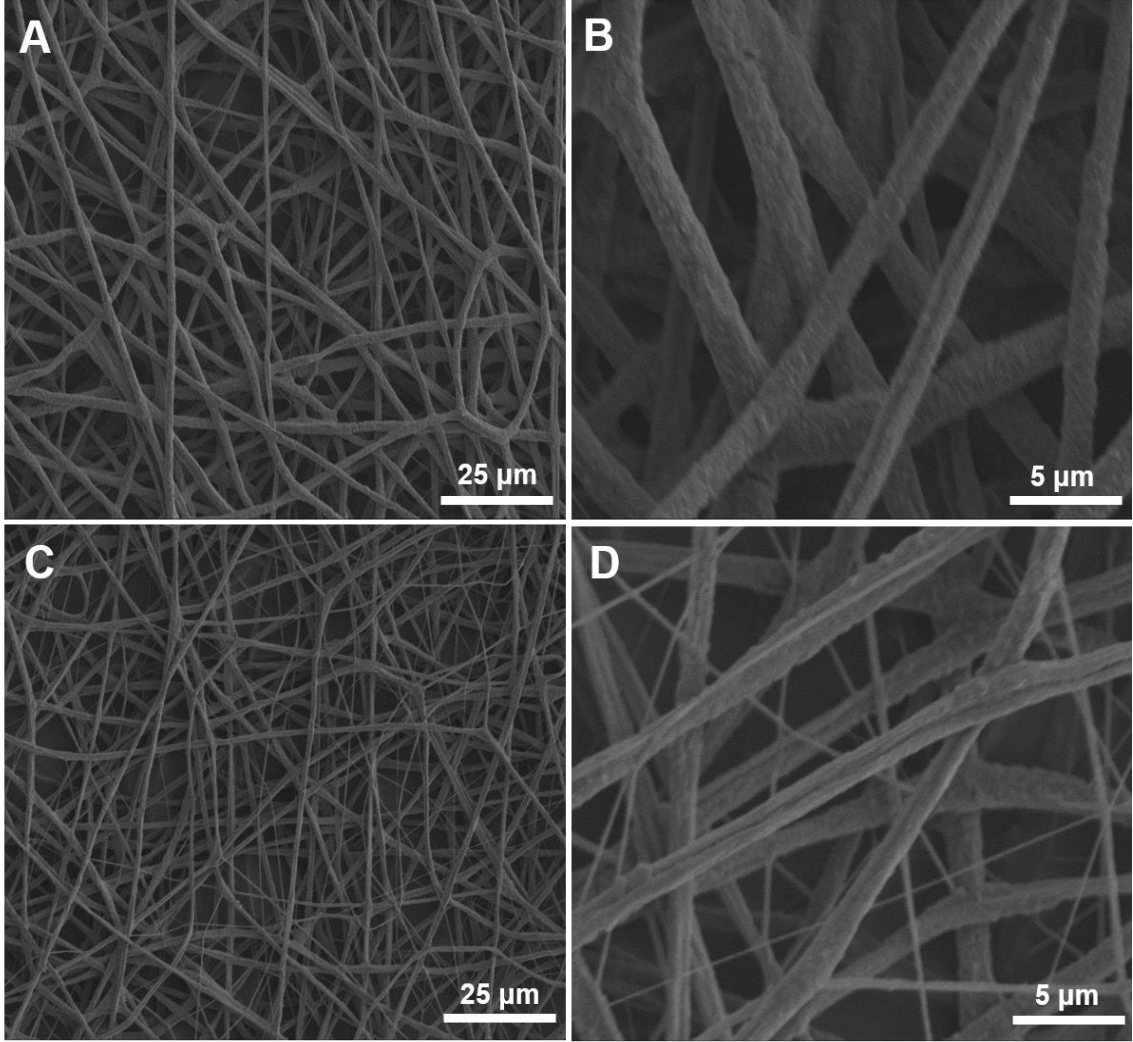
Fiber üretimi sırasında uygulanan voltaj değeri yüksek çözünürlüklü kamera ile jet oluşumunun stabil olduğu değerler sabit tutularak belirlenmiştir. PGS ve PXS 11 kV değerinde stabil jet oluştururken, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG 15 kV'da kararlı jet oluşturmuştur. Fiber üretimi sırasında ihtiyaç duyulan voltaj değerleri arasındaki fark polimer çözeltilerinin yüzey gerilimleri ve iletkenlikleri arasındaki fark ile açıklanabilir. Çizelge 4.5'de belirtildiği gibi yüzey gerilim değerleri PGS için  $6.87 \pm 0.01$  mN/m, PXS için  $6.94 \pm 0.02$  mN/m olarak ölçülürken, PGS-ko-PEG  $7.03 \pm 0.01$  mN/m ve PXS-ko-PEG için  $7.10 \pm 0.01$  mN/m olarak hesaplanmıştır. Polimer çözeltilerinin artan yüzey gerilimleri fiber oluşumu için aşılması gereken yüzey geriliminin artmasına yol açmaktadır. Bunun sonucunda uygulanması gereken elektriksel alan değeri de artış göstermektedir. Ayrıca çözeltilerin iletkenlik değerlerdeki artış jet oluşumunda şırınga-jet oluşumu arasındaki mesafenin kısalmasını sağlayarak toplayıcıdaki fiber alanını artırıcı etki göstermiştir [173]. Elde edilen jetlerin yüksek hız ve çözünürlüklü kamera yardımıyla video görüntüleri kaydedilmiştir. Bu videolardan alınan anlık görüntüler sırasıyla PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG için Şekil 4.50'de gösterilmiştir.



Şekil 4.50. Fiber jet görüntüleri A) PGS, B) PXS, C) PGS-*ko*-PEG ve D) PXS-*ko*-PEG (24 µL/dk akış hızında).

Şekil 4.51'de PGS:PVA karışımı ile 24 ve 48 µL/dk akış hızında üretilen fiber yapılarının SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.51 (A) ve (B) grupları 24 µL/dk akış hızında üretilen fiberlerin morfolojilerini sırasıyla düşük ve yüksek büyütmede göstermektedir. Şekil 4.51 (C) ve (D) örnek grupları ise, 48 µL/dk akış hızında üretilen fiberlerin morfolojilerini sırasıyla düşük ve yüksek büyütmede göstermektedir. SEM görüntüleri incelendiğinde, PGS:PVA harman yapılarından elde edilen fiber gruplarından 24 µL/dk akış hızında üretilen fiberlerin çap dağılımları  $1.4\pm 0.2$  µm olarak hesaplanırken, 48 µL/dk akış hızında üretilen fiberlerin çap dağılımları  $1.2\pm 0.6$  µm olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ışığında, EHD tabanca düzeneğinde PGS fiber üretimi için jet

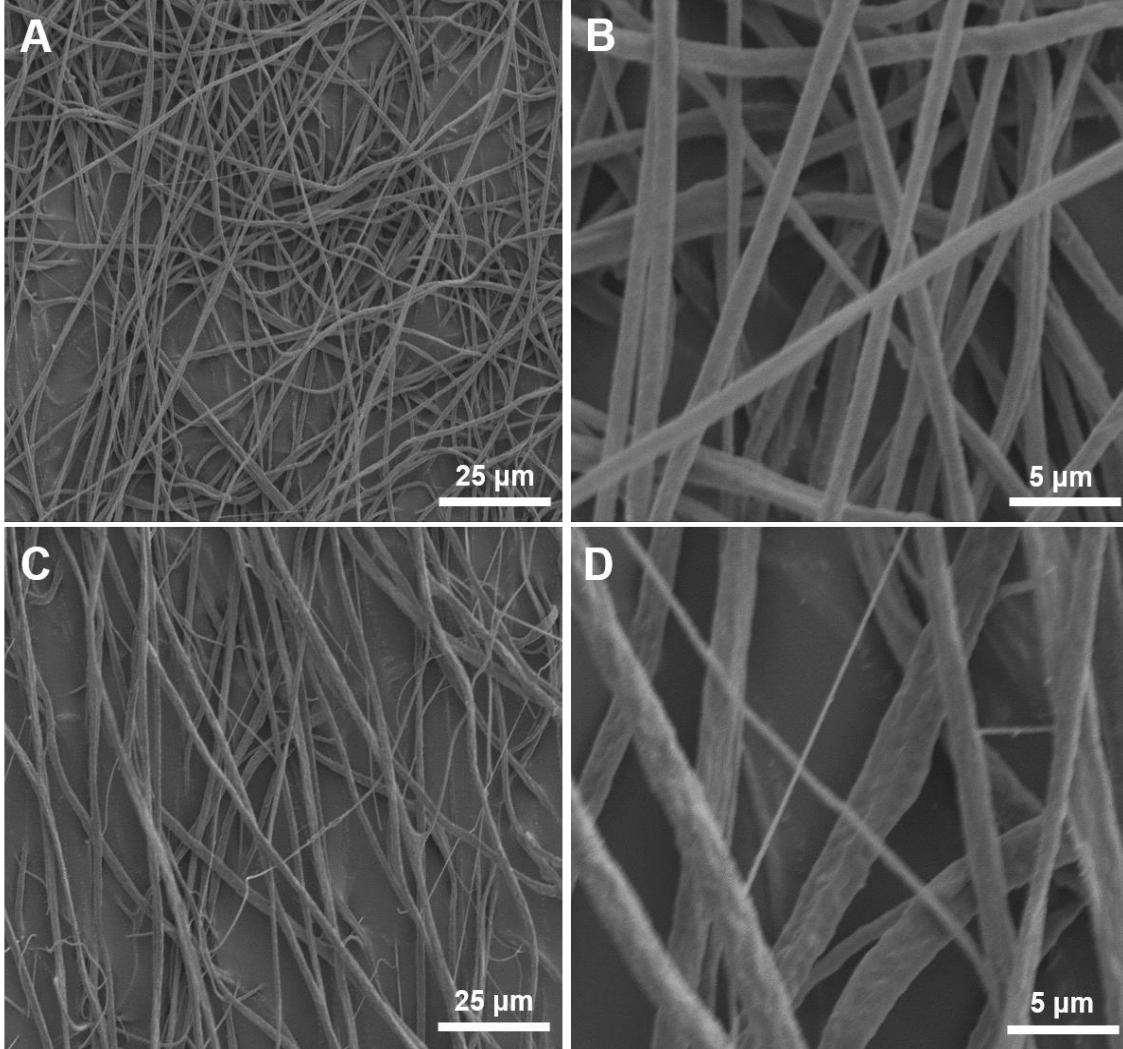
oluşumunun daha kararlı ve çap dağılımının daha homojen olmasından dolayı, en uygun akış hızının 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.51. PGS:PVA fiberlerin SEM görüntüleri. A) 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:25  $\mu\text{m}$ ), B) 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:5  $\mu\text{m}$ ), C) 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:25  $\mu\text{m}$ ) ve D) 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:5  $\mu\text{m}$ ).

Şekil 4.52'de, PXS:PVA karışımı ile 24 ve 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiber yapılarının SEM görüntüleri sunulmuştur. Şekil 4.52 (A) ve (B) grupları 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin, (C) ile (D) grupları 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin morfolojilerini sırasıyla düşük ve yüksek büyütmede göstermektedir. PXS:PVA harman yapılarından elde edilen fiberlerin 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında  $1.0\pm 0.1$   $\mu\text{m}$  çap dağılımına sahip olduğu hesaplanırken, 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin çap dağılımları  $1.4\pm 0.7$   $\mu\text{m}$  olarak hesaplanmıştır. EHD

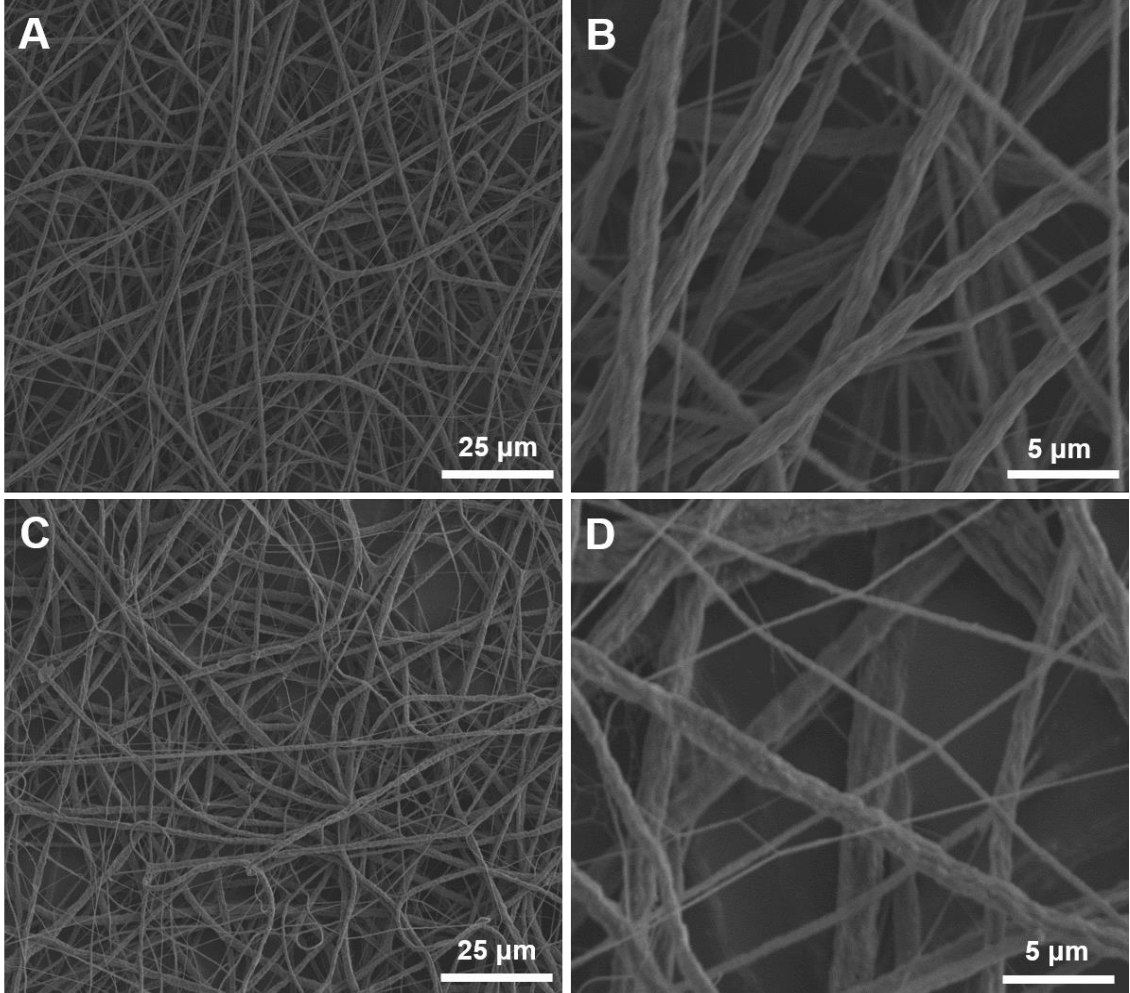
tabanca düzeneğinde PXS fiber üretimi için de PGS fiberlere benzer şekilde, 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında jet oluşumunun daha kararlı ve çap dağılımının daha homojen olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.52. PXS:PVA fiberlerin SEM görüntüleri. A) 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:25  $\mu\text{m}$ ), B) 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:5  $\mu\text{m}$ ), C) 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:25  $\mu\text{m}$ ) ve D) 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:5  $\mu\text{m}$ ).

Şekil 4.53, PGS-*ko*-PEG:PVA karışımı ile üretilen fiber yapılarının 24 ve 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı kullanılan örneklerinin SEM görüntülerini belirtmektedir. Şekil 4.53 (A) ve (B) grupları 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin, (C) ile (D) grupları 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin morfolojilerini sırasıyla düşük ve yüksek büyütmede göstermektedir. PGS-*ko*-PEG:PVA ile üretilen fiberlerin 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında  $1.1\pm 0.4$   $\mu\text{m}$  çap dağılımına sahip olduğu hesaplanırken,

48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin çap dağılımları  $1.2\pm 0.8$   $\mu\text{m}$  olarak hesaplanmıştır. PGS-*ko*-PEG fiber üretimi için, PXS ve PGS fiberlere benzer şekilde, 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında jet oluşumunun daha kararlı ve çap dağılımının daha homojen olduğu belirlenmiştir.

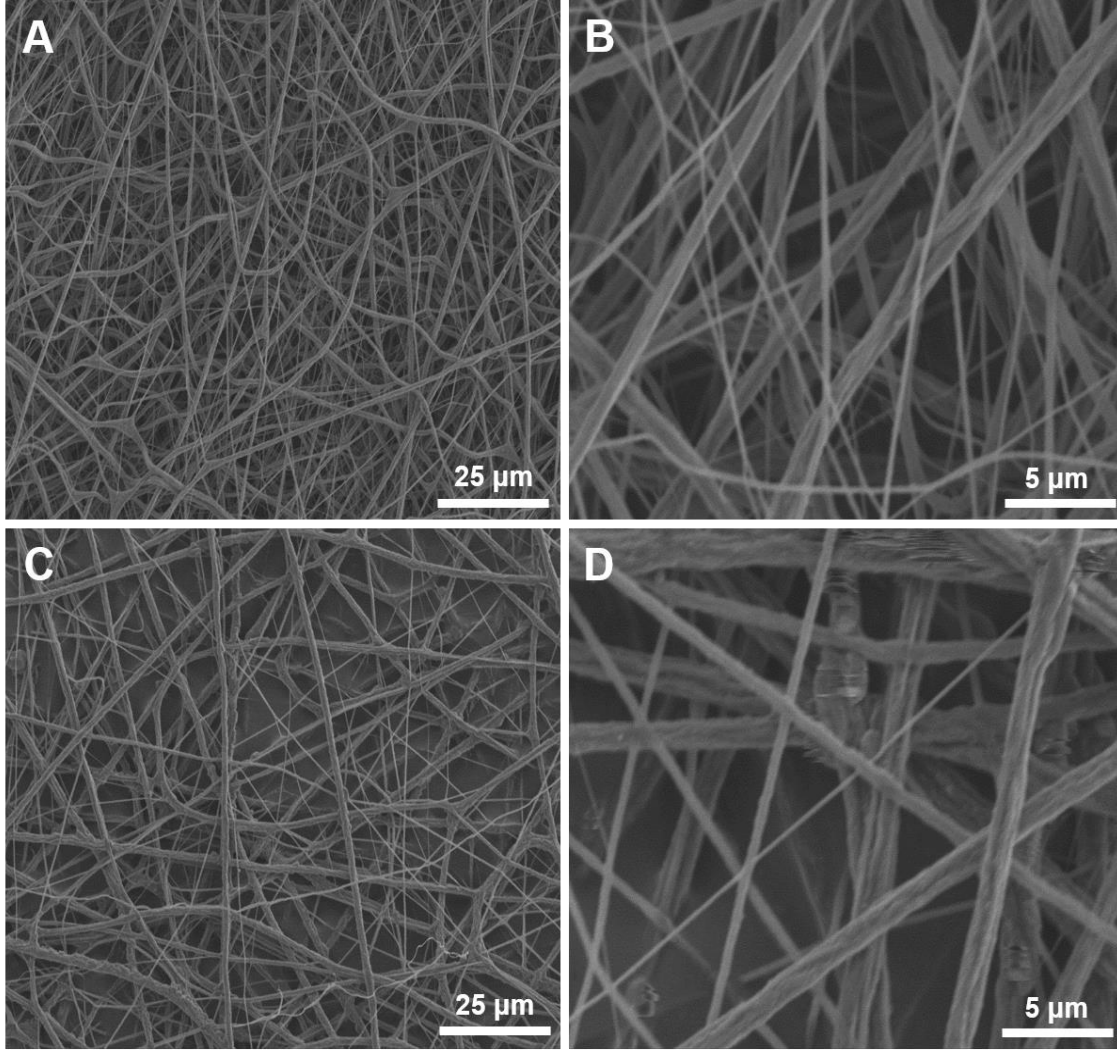


Şekil 4.53. PGS-*ko*-PEG:PVA fiberlerin SEM görüntüleri. A) 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:25  $\mu\text{m}$ ), B) 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:5  $\mu\text{m}$ ), C) 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:25  $\mu\text{m}$ ) ve D) 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:5  $\mu\text{m}$ ).

PXS-*ko*-PEG:PVA fiber üretimi için de, 24 ve 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı denenmiştir. Elde edilen fiber morfolojileri taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edilerek Şekil 4.54'de SEM görüntüleri sunulmuştur. Şekil 4.54 (A) ve (B) grupları 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin, (C) ile (D) grupları 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin morfolojilerini sırasıyla düşük ve yüksek büyütmede göstermektedir. PXS-*ko*-PEG:PVA ile üretilen fiberlerin 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$



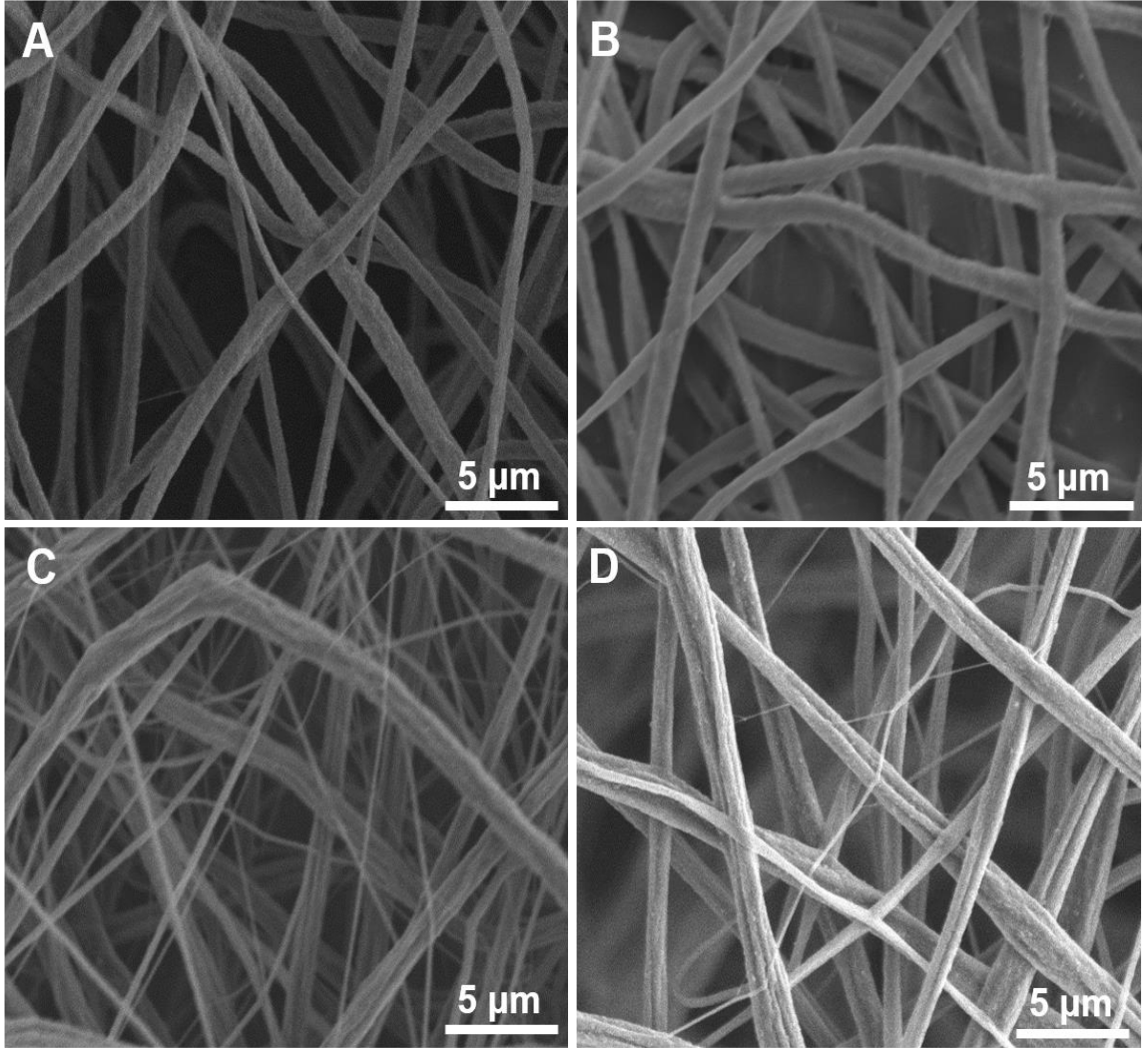
akış hızında  $0.9\pm 0.3$   $\mu\text{m}$  çap dağılımına sahip olduğu hesaplanırken, 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin çap dağılımları  $1.1\pm 0.5$   $\mu\text{m}$  olarak hesaplanmıştır. PXS-ko-PEG fiber üretimi için de 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında jet oluşumunun daha kararlı ve çap dağılımının daha homojen olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.54. PXS-ko-PEG:PVA fiberlerin SEM görüntüleri. A) 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:25  $\mu\text{m}$ ), B) 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:5  $\mu\text{m}$ ), C) 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:25  $\mu\text{m}$ ) ve D) 48  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı (ölçek:5  $\mu\text{m}$ ).

EHD ile üretilen fiber yapıları çapraz bağlanma işlemi sonrası yıkanarak PVA'nın yapıdan uzaklaşması sağlanmıştır. 24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında üretilen fiberlerin çapraz bağlanma ve yıkama işlemleri sonundaki morfolojileri Şekil 4.55'de gösterilmiştir. PVA'nın uzaklaştırılması sonrasında fiber yapılarının

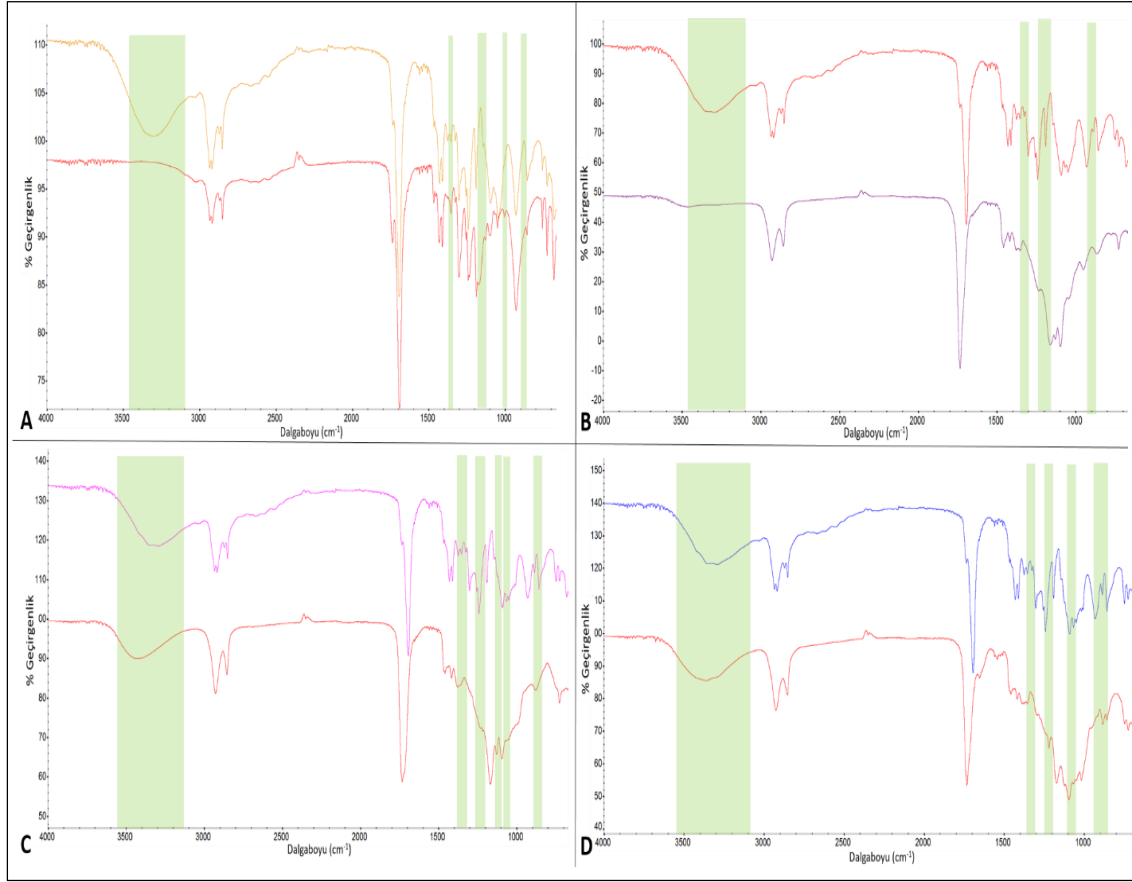
değişen çap dağılımları sırasıyla; PGS:  $0.8\pm0.2\ \mu\text{m}$ , PXS:  $0.8\pm0.1\ \mu\text{m}$ , PGS-ko-PEG:  $0.9\pm0.3\ \mu\text{m}$  ve PXS-ko-PEG:  $0.8\pm0.4\ \mu\text{m}$  olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.55. Çapraz bağlanmış ve yıkanmış fiberlerin morfolojileri. A) PGS, B) PXS, C) PGS-ko-PEG ve D) PXS-ko-PEG (24  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızında, ölçek:5  $\mu\text{m}$ ).

EHD tabanca ile üretilen fiberler ile fiberlerin çapraz bağlanma ve yıkama sonrasındaki kimyasal yapılarının FT-IR spektrumları Şekil 4.56'da karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PPS ve PVA yapılarında,  $1730\ \text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen ester pikleri (C=O),  $3150\text{-}3600\ \text{cm}^{-1}$  bandındaki -OH pikleri ve  $2800\text{-}3000\ \text{cm}^{-1}$  bandında gözlenen metilen pikleri (-CH<sub>2</sub>) polimer yapılarına ait karakteristik farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple karşılaştırma sonucunda  $3150\text{-}3600\ \text{cm}^{-1}$  bandındaki -OH piklerinin şiddetindeki çapraz bağlanma

sonrası azalma gözlenmiştir. Ayrıca, PVA'ya ait parmak izi bölgesindeki 1327  $\text{cm}^{-1}$  bandındaki C-H bükülmesi, 1240  $\text{cm}^{-1}$  bandındaki C=O titreşimi, 1140,920 ve 843  $\text{cm}^{-1}$  bandındaki C-O gerilimi ve 1240  $\text{cm}^{-1}$  bandındaki C-C gerilimindeki farklılıklar yapıdan başarı ile uzaklaştırıldığını spektroskopik olarak göstermektedir.

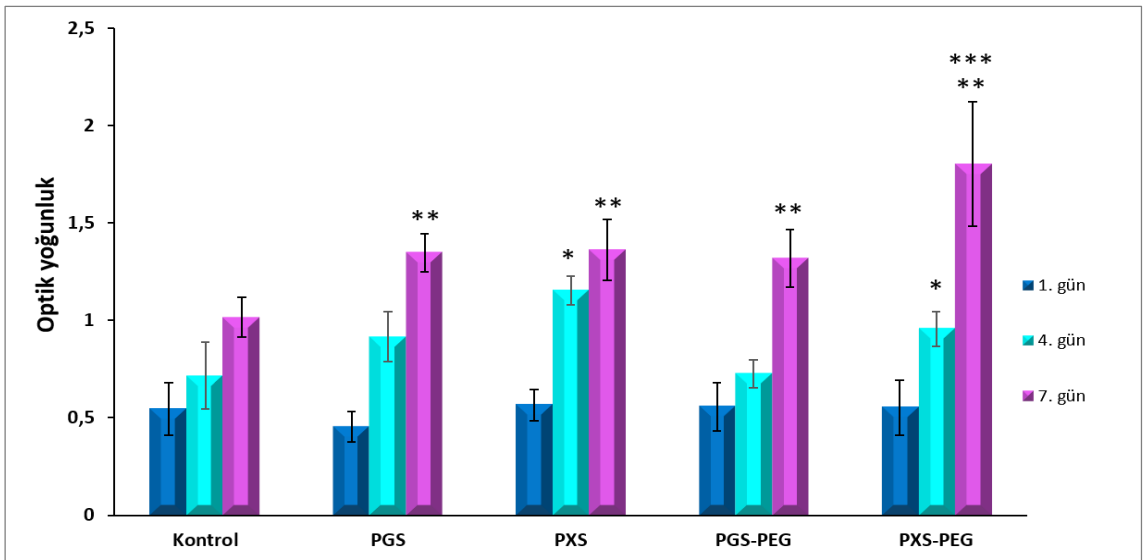


Şekil 4.56. Fiberlerin çapraz bağlanma ve yıkama işlemleri sonundaki FT-IR spektrumları. A)PGS, B)PGS-ko-PEG, C)PXS ve D)PXS-ko-PEG (24  $\mu\text{L}/\text{dak}$  akış hızında).

EHD tabanca ile üretilen PPS fiber yapıları başarı ile üretildikten sonra, potansiyel biyomalzeme uygulamalarında kullanılabilmesi için gerekli biyouyumluluk çalışmaları direkt MTT testi ile gerçekleştirilmiştir. Hücre kaynağı olarak ATCC dermal fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Malzeme yüzeyine ekimi gerçekleştirilen hücrelerin canlılık oranları 1, 4 ve 7 gün inkübasyon sonunda incelenmiş olup, tüm örnek gruplarındaki canlı hücre yoğunluğunun zamana bağlı grafikleri Şekil 4.57'de gösterilmiştir. Hazırlanan tüm fiber grupları 1, 4 ve

7 gün sonunda kontrol grubuna göre “toksik etki yok” sınırları içerisinde bulunmuştur.

Birinci günün sonunda hiçbir örnek grubunun kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir farkı bulunmamaktadır. 4. günün sonunda ise PXS ve PXS-ko-PEG örnek gruplarında canlı hücre sayısında diğer tüm örnek grupları ve kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. 7. günün sonunda PGS, PGS-ko-PEG, PXS ve PXS-ko-PEG örnek grupları hücre canlılığında diğer kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı fark içermektedir. Ayrıca PXS-ko-PEG örnek yüzeyindeki canlı hücre sayısının 7. gün sonunda istatistiksel olarak diğer tüm örnek gruplarına oranla anlamlı şekilde artış gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Direkt sitotoksite testi sonuçları PPS fiber yapılarının potansiyel biyomalzeme ve doku mühendisliği uygulamaları için herhangi bir toksik etki içermediğini göstermiş ve literatürde yapılan çalışmaları destekleyen sonuçlar elde edilmiştir [174, 175]. Ayrıca zamana bağlı olarak özellikle PXS-ko-PEG polimeriyle üretilen fiber yapılarının hücre proliferasyonunu destekler/arttırıcı yapıda özellik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.57. PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerinin direkt MTT test sonuçları. \*,\*\* ve \*\*\* anlamlı farkları ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ).

EHD taşınabilir tabanca ile üretilen PPS fiberlerin biyouyumlu oldukları göz önünde bulundurularak, ilerleyen biyofabrikasyon çalışmalarında yeni nesil 3-boyutlu fiber üretim tekniklerinden basınçlı jirasyon tekniği ile PPS fiberler üretilmiş olup, hücre davranışları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

#### **4.3.2. Basınçlı Jirasyon Tekniği ile Poli(poliol) Sebakat Jiro-Eğrilmiş Fiberler**

Basınçlı jirasyon tekniği literatürde ilk defa 2013 yılında Mahalingam ve ark. tarafından geliştirilmiştir [115]. Basınçlı jirasyon tekniği bilinen bir polimer çözeltisinin Rayleigh–Taylor kararsızlığı prensibine bağlı olarak x ekseninde Rayleigh dengesizliğinde oluşan küçülen damlacıkların manipüle edilerek polimer jet oluşumu sağlamasına dayanmaktadır [117]. Jiro-eğrilmiş fiberlerin üretimi sırasında, yüksek hızda dönmeye başlayan üretim kabında merkezkaç kuvveti oluşur ve içinde bulunan polimer çözeltisi yer değiştirmeye başlar. Aynı zamanda uygulanan basınç ile yaratılan basınç farkı da polimer çözeltisinin döner kap içerisinde dışarı çıkması yönünde kuvvet uygulamaktadır. Dönel kuvvet polimer çözeltisinin kabın deliklerinden dışarı çıkması için ana etkindir. Deliklerde oluşan polimer jeti, sıvı – hava arayüzündeki yüzey gerilimi ile oluşurken, sıvı damlacıkları ile gas basıncı arayüzüne bağlı olarak gelişen Marangoni stresi polimer damlacıklarının fiber jet oluşturmasını tetiklemektedir [122, 125].

Temel işlem parametrelerini dönüş hızı ve gaz basıncı oluşturmaktadır. Ayrıca toplayıcı mesafesi ve ortam koşulları (sıcaklık, nem) fiber oluşumu ve morfolojisinde etkilidir. Ortam koşullarında meydana gelen nem dengesizliği/artışı fiber morfolojisindeki homojenliği negatif etkilemektedir. Hazırlanan polimer-çözücü sisteminde kullanılan polimerin molekül ağırlığı, konsantrasyonu, viskozitesi ve çözücünün uçuculuğu (kaynama noktası) fiber çapını etkileyen çözelti parametreleridir. Ayrıca kullanılan jirasyon kabının delik boyutundaki değişim fiber çapı ile doğru orantılı olarak değişim göstermektedir [117]. Basınçlı jirasyon ile fiber üretim çalışmaları, ~ 60 mm çapında x 35 mm yüksekliğinde boyutlara ve 0.25 mm yarıçapında merkez çizgide 24 deliğe sahip alüminyum kap içerisinde gerçekleştirilmiştir. PPS bazlı jiro-eğrilmiş fiber üretim

çalışmalarına parametrelerin optimizasyonuna PGS ile başlanmıştır. PGS:PVA oranı (55:45) olarak sabit tutularak farklı molekül ağırlıklarında PVA kullanılarak % 5, % 10 ve % 15'lük konsantrasyonlarda polimer çözeltileri hazırlanarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PVA molekül ağırlığının ve konsantrasyonun fiber oluşumuna etkisi Çizelge 4.6'da özetlenmiştir.

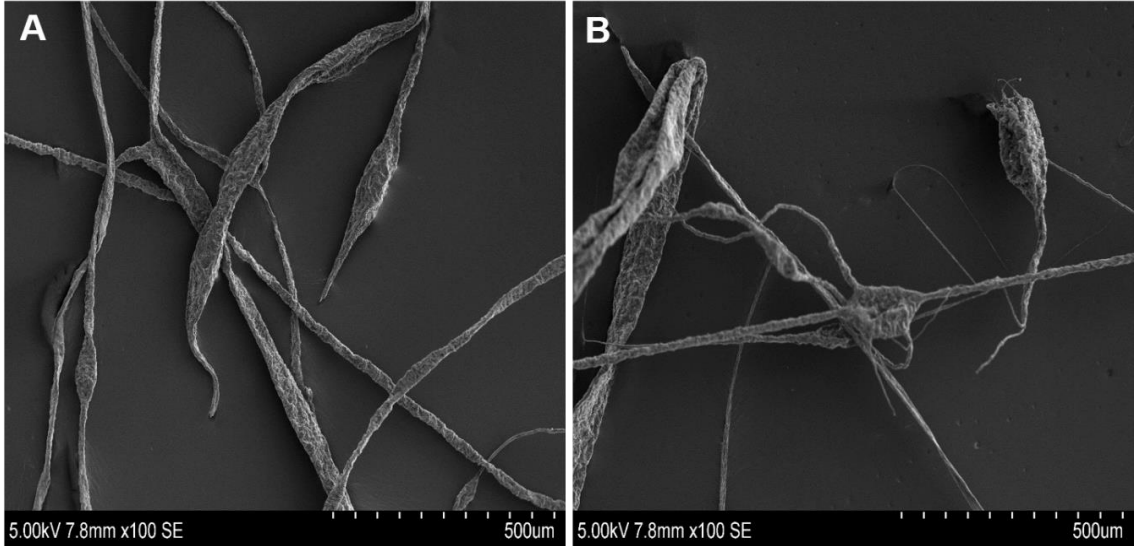
Çizelge 4.6. PVA molekül ağırlığının fiber oluşumuna etkisi.

	pPGS:PVA <sub>L</sub>			pPGS:PVA <sub>M</sub>			pPGS:PVA <sub>H</sub>		
<b>PVA Mw</b>	<b>30,000-70,000</b>			<b>89,000-98,000</b>			<b>146,000-186,000</b>		
<b>PPS:PVA % (w/v)</b>	15	10	5	15	10	5	15	10	5
<b>Çözelti konsantrasyonu</b>									
<b>Fiber üretimi</b>	V	V	O	X	X	V	X	X	V

V: fiber oluşumu gerçekleşti,

X: basınçlı jirasyon kabını delikleri tıkanmış-fiber oluşmadı,

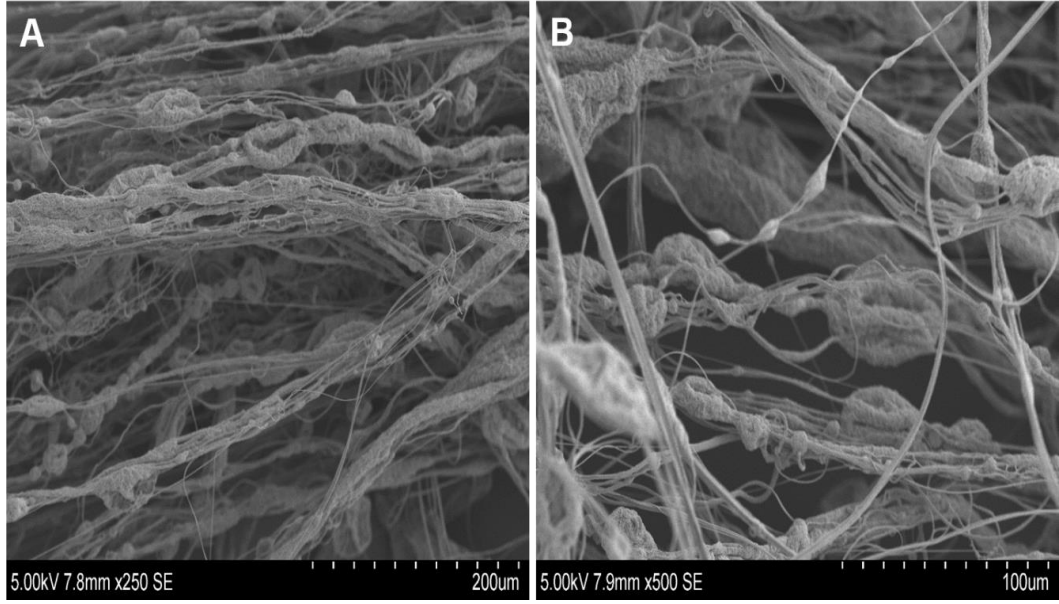
O: fiber oluşumu gerçekleşmedi.



Şekil 4.58. % 5'lik PGS:PVA çözeltisi ile üretilen fiberlerin SEM görüntüleri. A) orta molekül ağırlıklı PVA, B) yüksek molekül ağırlıklı PVA.

Orta (pPGS:PVA<sub>M</sub>) ve yüksek (pPGS:PVA<sub>H</sub>) molekül ağırlıklı PVA kullanılan çözeltilerin % 10 ve % 15'lik polimer çözeltilerinde fiber oluşumu gözlenmemiş, jirasyon kabının deliklerinde tıkanma oluşmuştur. Orta ve yüksek molekül ağırlıklı PVA kullanılan % 5'lik polimer çözeltileri ile yapılan çalışmalara ait SEM görüntüleri Şekil 4.58'de verilmiştir. pPGS:PVA<sub>M</sub> ve pPGS:PVA<sub>H</sub>'nin % 5'lik konsantrasyonunda fiber yapıları ile birlikte boncuk oluşumu gözlenmiştir. Düşük (pPGS:PVA<sub>L</sub>) molekül ağırlıklı PVA kullanılan çözeltilerin % 5'lik (w/v) konsantrasyonunda jet oluşumu ve fiber üretimi gerçekleşmemiştir. Diğer taraftan % 10'luk konsantrasyonda yüksek baloncuk oluşumu gözlenirken (Şekil 4.59), % 15'lik konsantrasyonda düzgün morfolojide fiberler elde edilmiştir (Şekil 4.60). % 10'luk polimer çözeltisinin viskozite değeri  $31.4 \pm 0.3$  mPa s ve % 15'lik çözeltinin ise  $90.2 \pm 0.4$  mPa s olarak bulunmuştur. HFIP çözücü sisteminde hazırlanan PPS:PVA çözeltilerine ait viskozite değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerlerine ait viskozite değerleri optimize edilen PGS:PVA çözeltisine yakın bulunmuş olup, fiber üretiminde baloncuk oluşumu ve düzensizlik gözlenmemiştir.

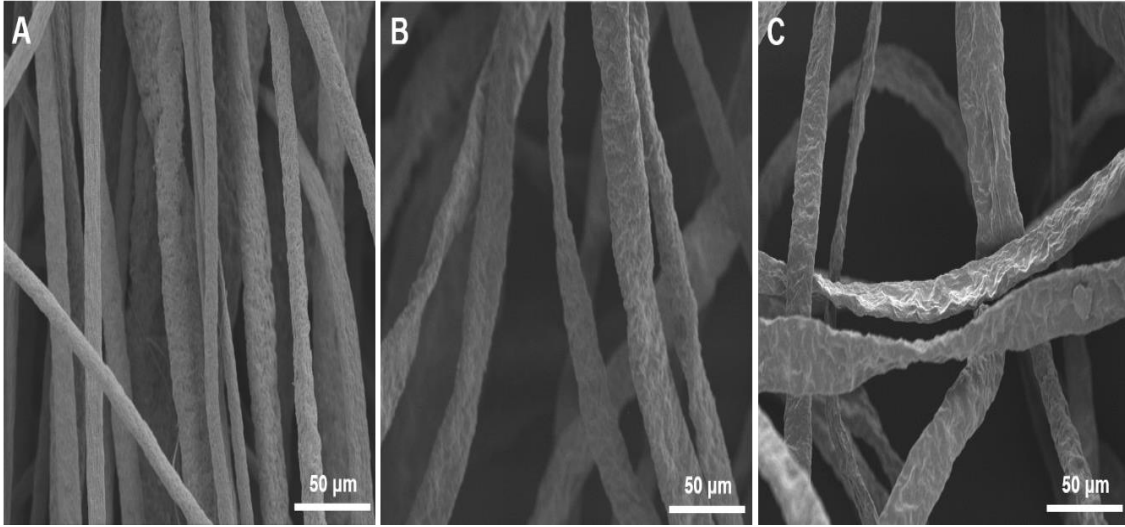
Optimize edilen koşullarda gerçekleştirilen basınçlı jirasyon tekniği ile fiber üretim çalışmalarında dönüş hızı, konsantrasyon, basınç ve ortam koşulları (sıcaklık, nem) sabit tutularak PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerleri ile PVA çözeltileri kullanılarak jiro-eğrilmiş fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan fiber yapılarının morfolojileri çapraz bağlanma öncesi, sonrası ve PVA'nın yapıdan uzaklaştırılması basamaklarında morfoloji ve çap dağılımı açısından incelenmiştir (Şekil 4.60-4.63).



Şekil 4.59. % 10'luk PGS:PVA çözeltisi ile üretilen jiro-fiberlerin SEM görüntüleri (PVA:düşük molekül ağırlıklı). A) 250x büyütme, B) 500x büyütme.

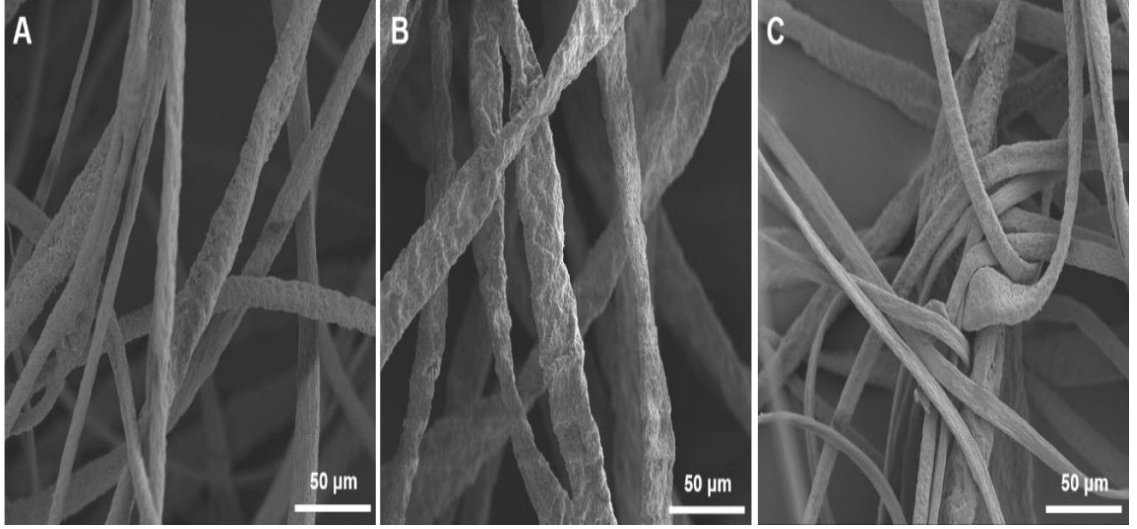
% 15'lik (w/v) pPGS:PVAL çözeltisi ile üretilen PGS:PVA jiro-eğilmiş fiber morfolojileri Şekil 4.60'de verilmiştir. Fiber çapları jirasyon sonrası  $15.6 \pm 4.2 \mu\text{m}$ , çapraz bağlanma sonrası  $15.8 \pm 3.1 \mu\text{m}$  ve yıkama işlemi sonrası  $11.8 \pm 2.9 \mu\text{m}$  olarak hesaplanmıştır. Termal çapraz bağlanma işlemi sonrasında çap dağılımında değişiklik gözlenmemiştir. Ancak PVA ve reaksiyona girmemiş PGS monomerlerinin, su ve ethanol yıkamaları ile yapıdan uzaklaştırılmasıyla çap dağılımında ~% 25 azalma gözlenmiştir. Fiber morfolojileri incelendiğinde ise fiberlerin çapraz bağlama sonrasında kademeli olarak yassılaştığı gözlenmiştir.



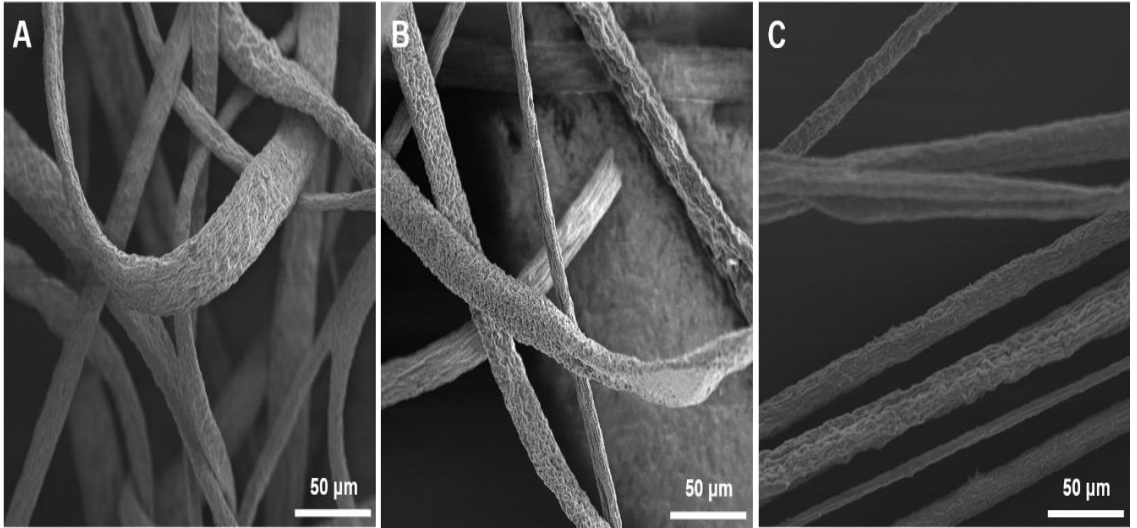


Şekil 4.60. PGS:PVA jiro-fiberlerin A) basınçlı jirasyon, B) termal çapraz bağlama ve C) yıkama işlemleri sonrası SEM görüntüleri.

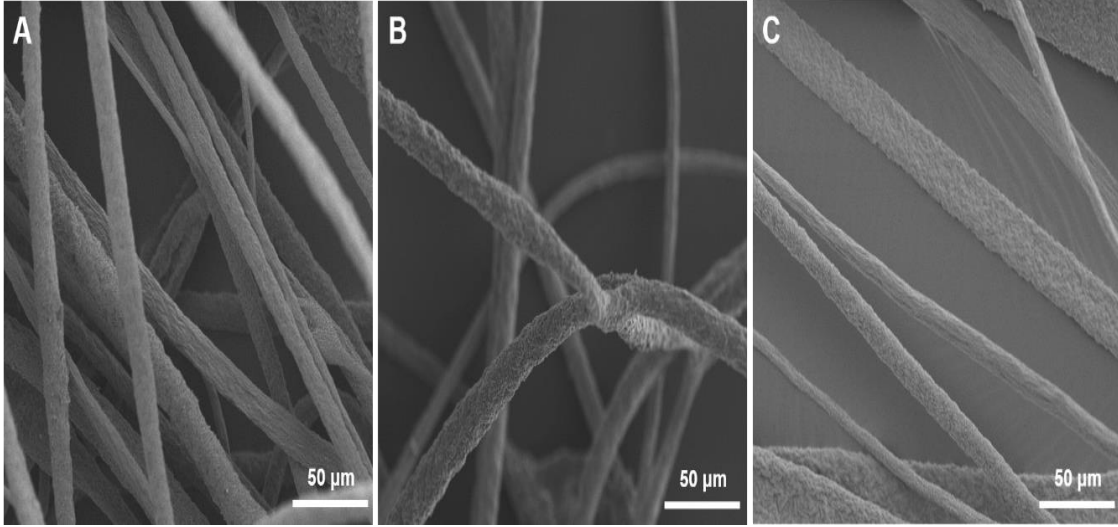
Şekil 4.61’de PXS:PVA jiro-eğilmiş fiberlerinin SEM görüntüleri sunulmuştur. Fiber çapları jirasyon sonrası  $14.4\pm 3.3\mu\text{m}$ , çapraz bağlanma sonrası  $18.4\pm 3.7\mu\text{m}$  ve yıkama işlemi sonrası  $12.4\pm 3.1\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. PGS-ko-PEG:PVA jiro-eğilmiş fiber morfolojileri incelendiğinde (Şekil 4.62) fiber çapları jirasyon sonrası  $17.6\pm 6.0\mu\text{m}$ , çapraz bağlanma sonrası  $16.8\pm 5\mu\text{m}$  ve yıkama işlemi sonrası  $12\pm 3\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. PXS-ko-PEG:PVA jiro-eğilmiş fiberlerinin SEM görüntüleri ise Şekil 4.63’de sunulmuş olup fiber çapları jirasyon sonrası  $12\pm 3\mu\text{m}$ , çapraz bağlanma sonrası  $12.5\pm 2.0\mu\text{m}$  ve yıkama işlemi sonrası  $10.8\pm 3.4\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. PGS:PVA jiro-eğilmiş fiberlerde benzer şekilde PVA’nın yapıdan uzaklaşmasıyla fiber çaplarında düşüş gözlenirken morfolojilerinde de benzer yassılaşıma gözlenmiştir.



Şekil 4.61. PXS:PVA jiro-fiberlerin A) basınçlı jirasyon, B) termal çapraz bağlama ve C) yıkama işlemleri sonrası SEM görüntüleri.

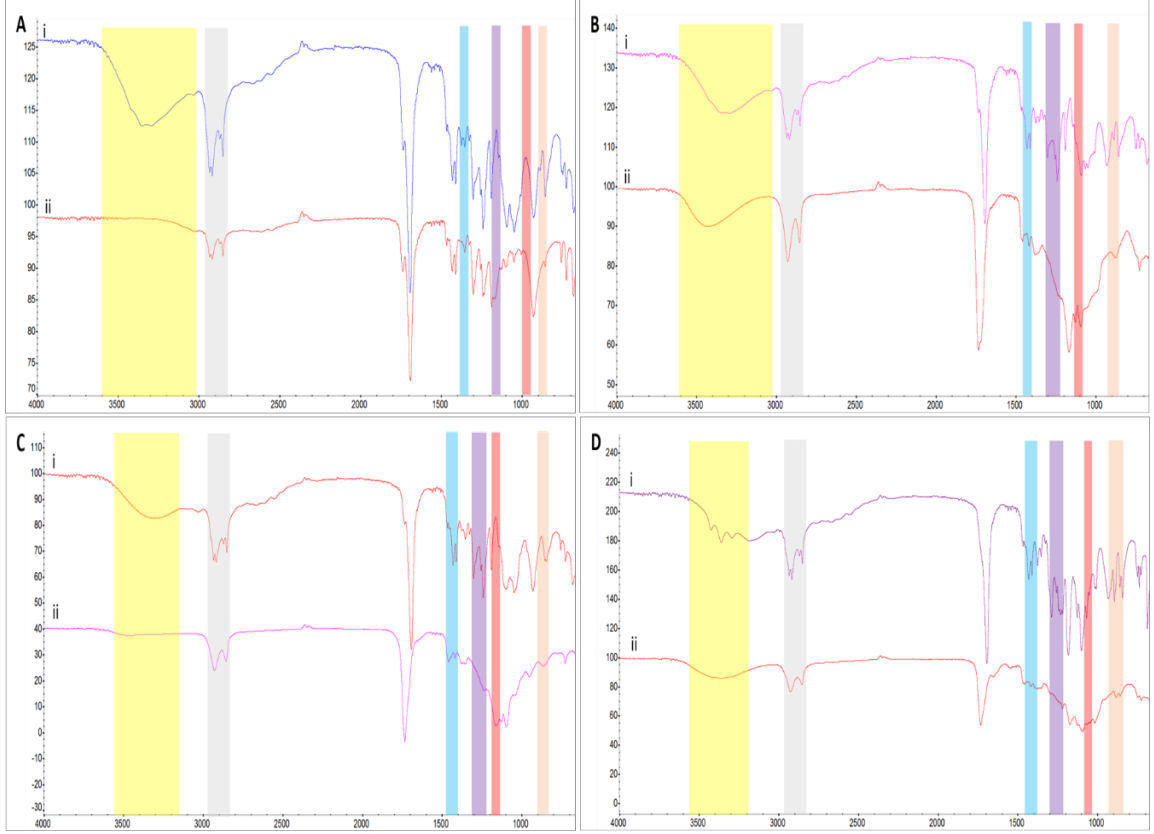


Şekil 4.62. PGS-ko-PEG:PVA jiro-fiberlerin A) basınçlı jirasyon, B) termal çapraz bağlama ve C) yıkama işlemleri sonrası fiber morfolojilerinin SEM görüntüleri.



Şekil 4.63. PXS-ko-PEG:PVA jiro-fiberlerin A) basınçlı jirasyon, B) termal çapraz bağlama ve C) yıkama işlemleri sonrası morfolojilerinin SEM görüntüleri.

Şekil 4.64'de basınçlı jirasyon tekniği ile üretilen fiberlerin çapraz bağlanma ve yıkama sonrasındaki kimyasal yapılarının FT-IR spektrumları karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerleri ile üretilen fiber yapılarına ait karşılaştırmalı FT-IR spektrumu sırasıyla 4.64 A, B, C ve D'de belirtilmiştir. PPS ve PVA polimerlerinin kimyasal yapılarında gözlenen,  $1730\text{ cm}^{-1}$ 'de ester (C=O),  $3150\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ 'de hidroksil ve  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  bandında gözlenen metilen pikleri polimer yapılarına ait karakteristik farklılıklar göstermemektedir. EHD taşınabilir tabanca ile üretilen fiberlerin yıkama sonrası kimyasal yapılarının karşılaştırılmasında olduğu gibi jiro-eğrilmiş fiberlerin yıkama veriminin değerlendirilebilmesi için, PVA'ya ait parmak izi bölgesinde gözlenen piklerin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Spektrum incelendiğinde  $1327\text{ cm}^{-1}$  bandındaki C-H bükülmesi,  $1240\text{ cm}^{-1}$  bandındaki C=O titreşimi,  $1140$ ,  $920$  ve  $843\text{ cm}^{-1}$  bandındaki C-O gerilimi ve  $1240\text{ cm}^{-1}$  bandındaki C-C gerilimindeki farklılıklar PVA'nın fiber yapılarından yıkanarak uzaklaştırıldığını spektroskopik olarak göstermektedir.



Şekil 4.64. Jiro-eğrilmiş fiberlerin çapraz bağlanma ve yıkama işlemleri sonrası FT-IR spektrumları A) PGS, B) PXS, C) PGS-ko-PEG ve D) PXS-ko-PEG.

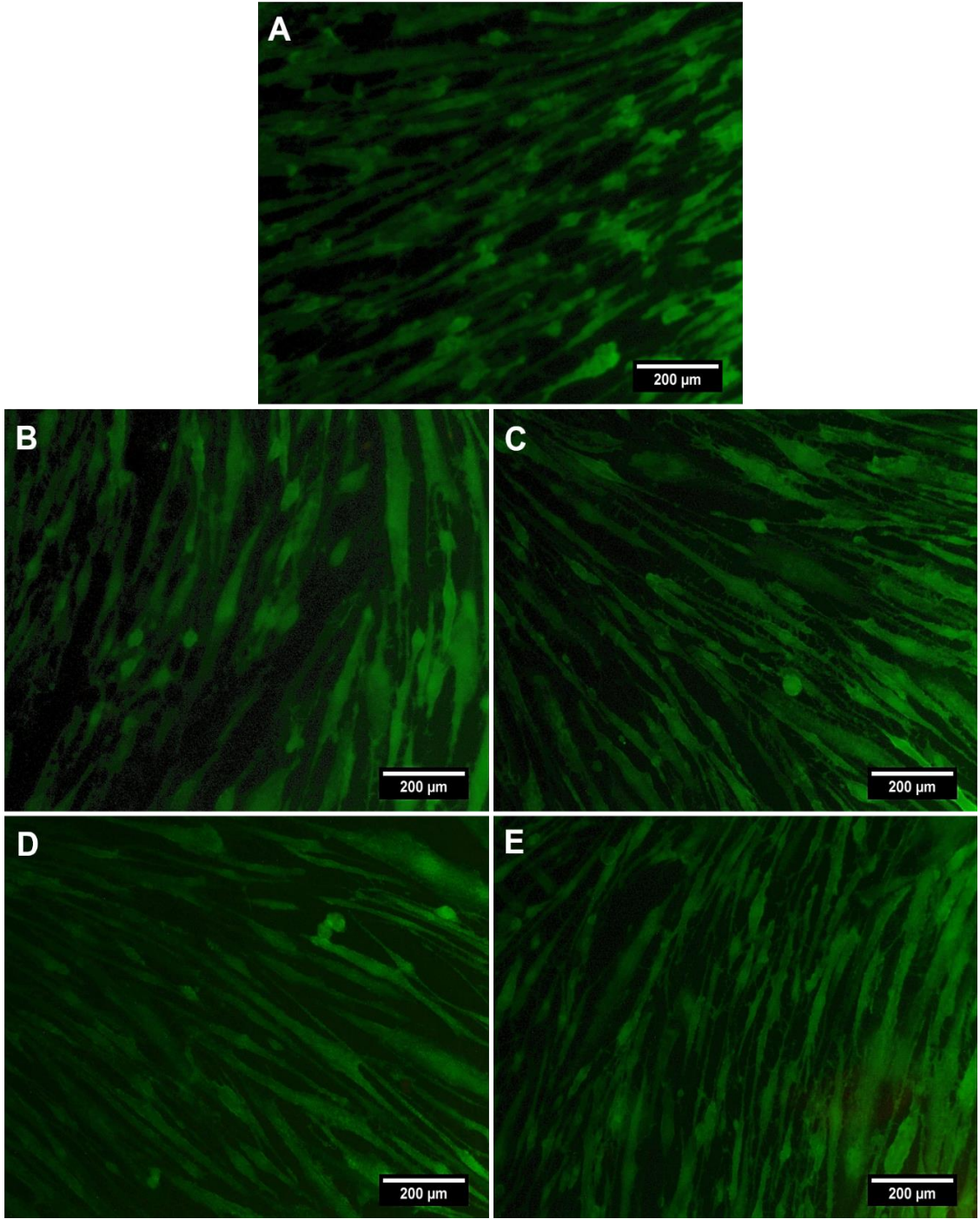
Basınçlı-jirasyon tekniği ile PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG polimerleri kullanılarak jiro-eğrilmiş fiber yapıları üretilebilmesi için gerekli optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve tüm PPS polimerleri ile fiber üretimi başarıyla sağlanmıştır. Ayrıca çapraz bağlanma işlemi sonrasında fiber yapılarının morfolojilerini koruduğu gözlenmiştir. Çapraz bağlama ve yıkama işlemleri sonrasında, yapıdan PVA başarı ile uzaklaştırılmıştır. Kullanılan iki farklı fiber üretim tekniği karşılaştırıldığında, EHD taşınabilir tabanca sistemi ve basınçlı jirasyon tekniği ile üretilen fiber yapıları arasında çap büyüklükleri ve yığın yapıları büyük ölçüde farklılık göstermiştir. EHD taşınabilir tabanca sistemi ile üretilen fiberler  $\sim 0.8-1.0 \mu\text{m}$  çap aralığında iken, jiro-eğrilmiş fiber yapıları  $\sim 11-12 \mu\text{m}$  çap ölçülerine sahiptir. Ayrıca düşük çap değerlerine sahip EHD fiberler daha düşük porozite ve fiberler arası boşluğa sahip, film yapısında iken; jiro-eğrilmiş fiberlerin yığın yapısı hayli poröz ve kesit alanı oldukça yüksek 3-boyutlu fiziksel forma sahip olduğu belirlenmiştir.

#### 4.4. EHD ve Jiro Eğrilmiş Fiberlerin Hücre Etkileşimleri

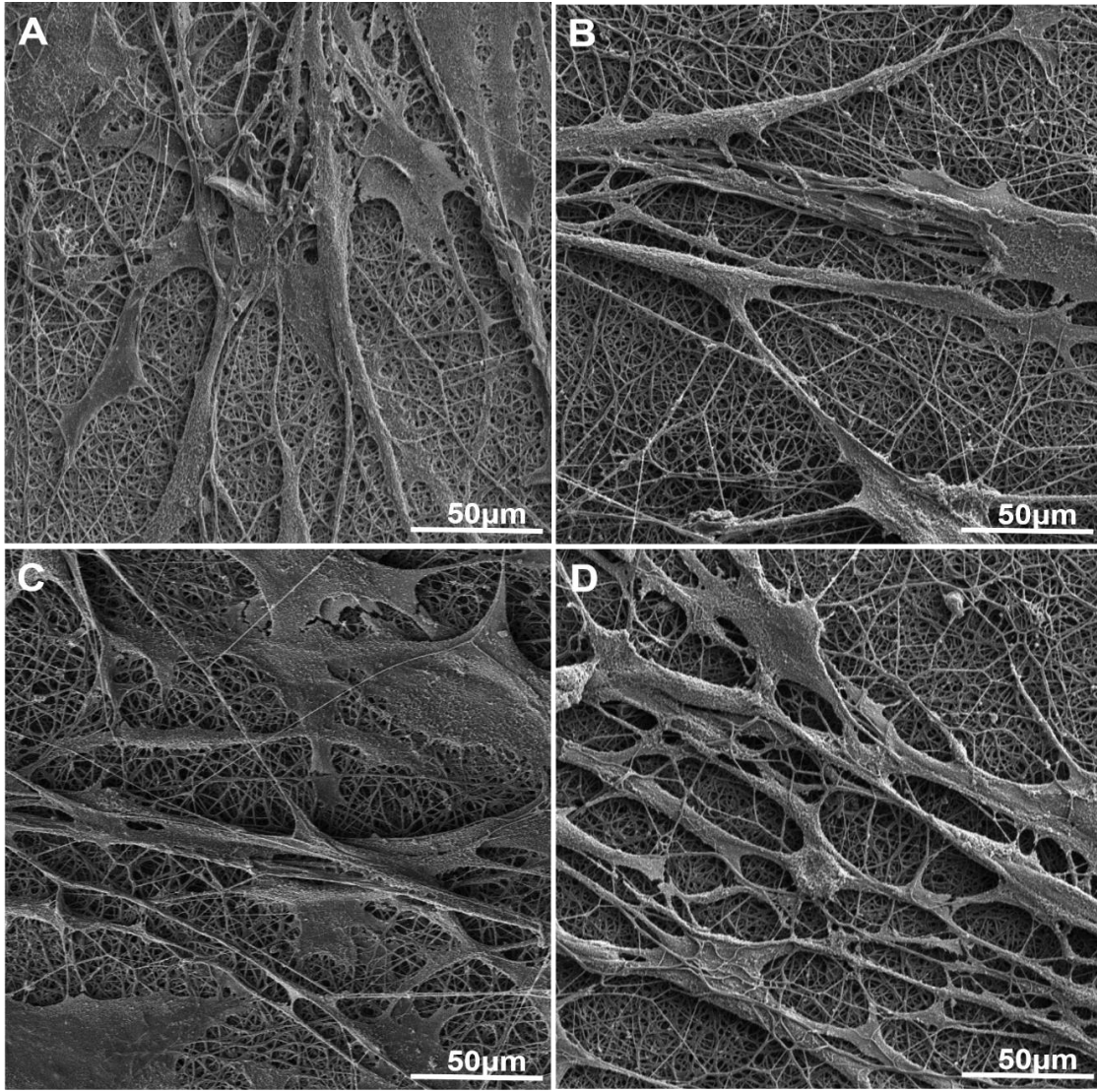
EHD taşınabilir tabanca ve basınçlı jirasyon teknikleri ile üretilen fiberlerin hücre etkileşimleri, üretim sırasında kullanılan çözücü ya da monomer kalıntılarından kaynaklanabilecek olası toksik etkisi canlı/ölü hücre testi ve SEM görüntülemeleri ile incelenmiştir.

EHD tabanca ile üretilen fiberlerin dermal fibroblast hücreleri ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında; 1, 4 ve 7. gün inkübasyon sonunda gerçekleştirilen direkt sitotoksite çalışmaları Şekil 4.57'de sunulmuştur. EHD tabanca ile üretilen fiberlerin 7. gün sonunda gerçekleştirilen canlı/ölü hücre testi sonuçları ise Şekil 4.65'te verilmiştir. Doku kültür kabı (TCP) yüzeyinin kontrol grubu olarak kullanıldığı çalışmalar sonucunda, üretilen fiber yapılarının hücre canlılığına herhangi bir toksik etki yaratmadığı tespit edilmiştir. Tüm fiber örnek gruplarında kontrol grubuna benzer şekilde yüksek oranda hücre canlılığı tespit edilmiş olup, hücrelerin fiber yüzeylerine tutunduğu ve canlılığını devam ettirdiği gözlenmiştir. Ayrıca, EHD tabanca ile üretilen PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG fiberlerin 7. gün inkübasyon sonunda hücrelerin fikse edilmesiyle elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.66'da belirtilmiştir. EHD tabanca ile üretilen PGS, PXS, PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG fiberlerin SEM görüntüleri Şekil 4.65'de belirtilen canlı/ölü hücre testi ile elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri ile benzer sonuçlar içermektedir. SEM görüntüleri de hücrelerin yüzeye tutunduğunu ve yayıldığını göstermektedir.

Yan ve ark. tarafından yapılan çalışmada PGS polimeri kullanılarak elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen fiberlerin yetişkin fare hipotalamusu kaynaklı nöron hücreleri ile etkileşimleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 1, 3 ve 5. günün sonunda hücrelerin malzeme yüzeyinde yayıldığı, hücreler arası etkileşimin kurulduğu ve özellikle 5. günün sonunda hücre proliferasyonunda artış gözlemlendiği rapor edilmiştir [176]. PGS örneğine benzer şekilde tez kapsamında üretilen diğer PPS fiber gruplarının da toksik etki göstermediği, hücre tutunması ve canlılıklarını korudukları gözlenmiştir.



Şekil 4.65. Fibroblast hücrelerin EHD tabanca ile üretilen fiberlerle kültürünün 7. gün canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) TCP-kontrol, B) PGS, C) PXS, C) PGS-*ko*-PEG ve D) PXS-*ko*-PEG.



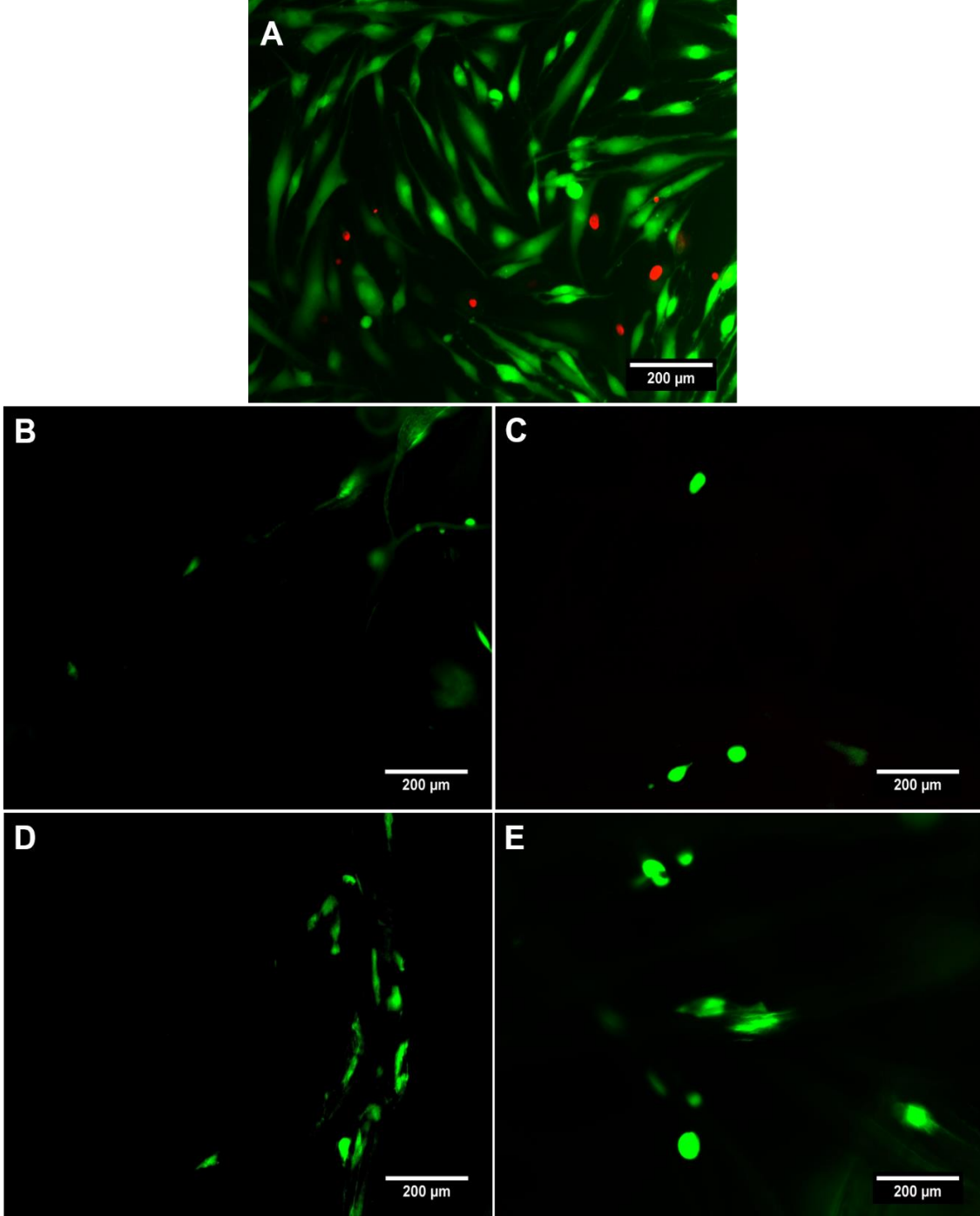
Şekil 4.66. Fibroblast hücrelerin EHD tabanca ile üretilen fiberlerle 7. gün SEM görüntüleri. A) PGS, B) PXS, C) PGS-*ko*-PEG ve D) PXS-*ko*-PEG.

Basınçlı jirasyon tekniği ile üretilen fiberlerin 1, 4 ve 7 gün sonunda PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG fiberleri için gerçekleştirilen canlı/ölü hücre testlerine ait floresan mikroskop görüntüleri sırasıyla 4.67, 4.68 ve 4.69'da belirtilmiştir. Kontrol grubu olarak TCP kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, jirasyon tekniği ile üretilen fiberlerin de EHD tekniği ile üretilen fiberlere benzer şekilde toksik bir etki içermediğini desteklemiştir. TCP kontrol grubununa kıyasla, jiro-eğrilmiş fiberlere ait floresan mikroskop görüntülerinde daha az sayıda hücre tespit edilmiştir. Bunun sebebi; TCP kontrol grubu 2-boyutlu yüzey

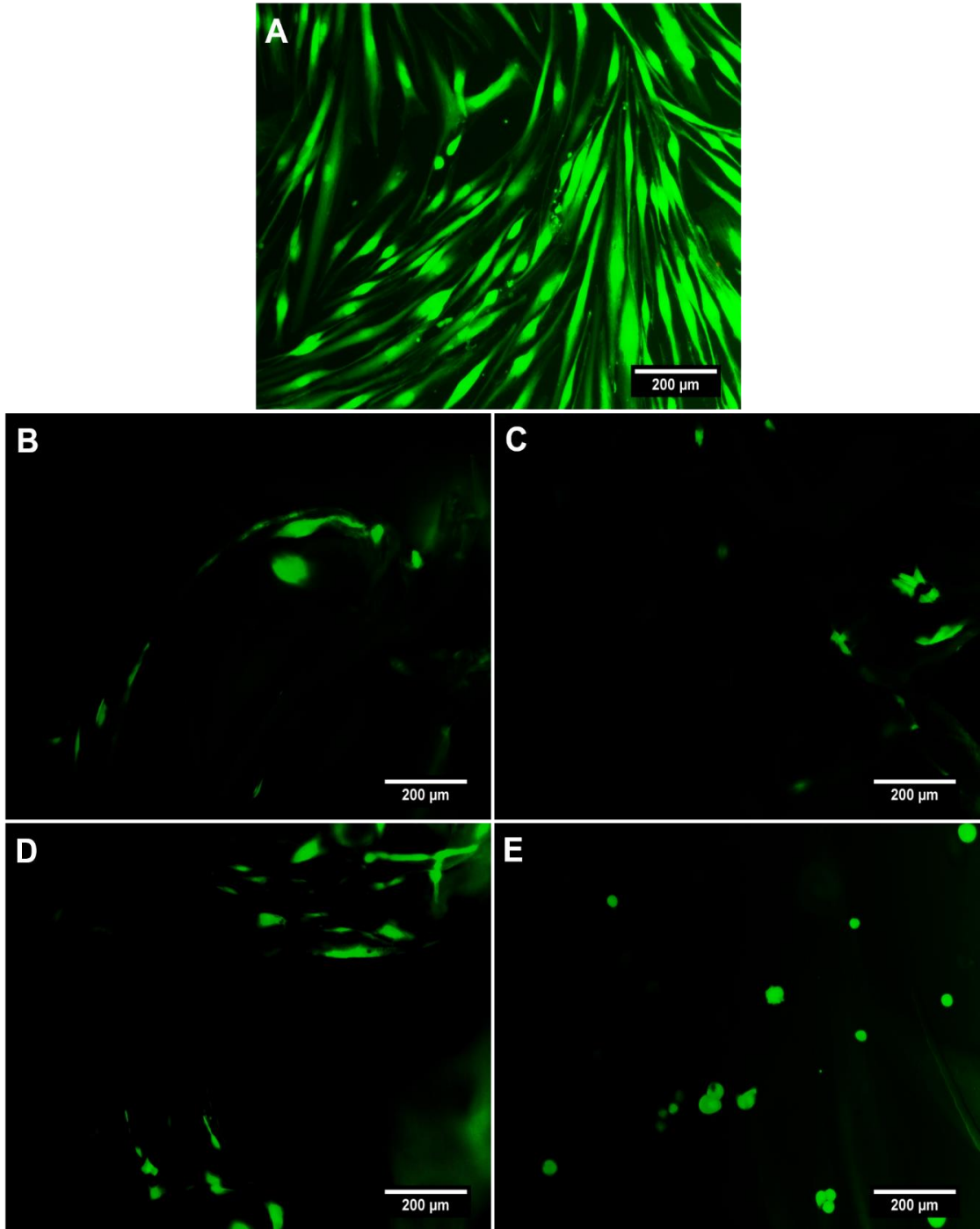
alanına sahipken, jiro-eğrilmiş fiberlerin yüksek oranda porozite içeren 3-boyutlu daha geniş bir yüzey alanında morfolojiye sahip olmasından dolayı hücrelerin daha geniş alana yayılarak görüntülemelerde kontrole göre daha az sayıda belirlenmesidir. Jiro-eğrilmiş fiberler incelendiğinde 1, 4 ve 7 günlerde, zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Ayrıca jiro-eğrilmiş fiberlerin hücre etkileşimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında PGS, PXS fiber gruplarına kıyasla PGS-ko-PEG ve PXS-ko-PEG örnek gruplarında hücre tutunması ve proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Özellikle 7. günde PXS-ko-PEG jiro-eğrilmiş fiberlerde hücre tutunmasında ciddi anlamda artış gözlenmiştir. Jiro-eğrilmiş fiberlerin 7 gün inkübasyon sonunda elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.70'de belirtilmiştir. SEM görüntüleri de floresan mikroskop görüntüleri ile benzer sonuçlar içermektedir. Hücrelerin fiber yüzeyine tutunduğu ve yayıldığı gözlenmektedir. Özellikle PXS-ko-PEG jiro-eğrilmiş fiber yüzeyinde tutunan hücrenin fiberlere sarılarak yayıldığı gözlenmiştir.

Literatürde, Xu ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada basınçlı eriyik jirasyon ile üretilen PCL jiro-eğrilmiş fiberler ile gerçekleştirilen çalışmada jiro-eğrilmiş fiber yapıları ile etkileşen hücrelerin proliferasyonunun zamana bağlı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir [116]. Basnett ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, polihidroksialkanoat ile üretilen jiro-eğrilmiş fiberler ve aynı malzeme ile hazırlanan film yüzeylerin C2C12 miyoblast ve HMEC-1 mikrovasküler endotel hücreleri ile etkileşimleri karşılaştırılmıştır. Jiro-eğrilmiş polihidroksialkanoat elastomerik fiberlerde film yüzeylere kıyasla hücre tutunması, çoğalması ve yayılmasının her iki hücre türü için de istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği rapor edilmiştir [177]. Literatürde yapılan çalışmalar ve tez kapsamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda; basınçlı jirasyon tekniğinin eriyik, çözelti, beslemeli üretim seçenekleri ile hızlı ve kolay üretim koşulları, jiro-eğrilmiş fiber yapılarının yüksek yüzey alanı-hacim oranı göz önünde bulundurularak biyomalzeme ve doku mühendisliği uygulamaları için umut vadeden bir üretim aracı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

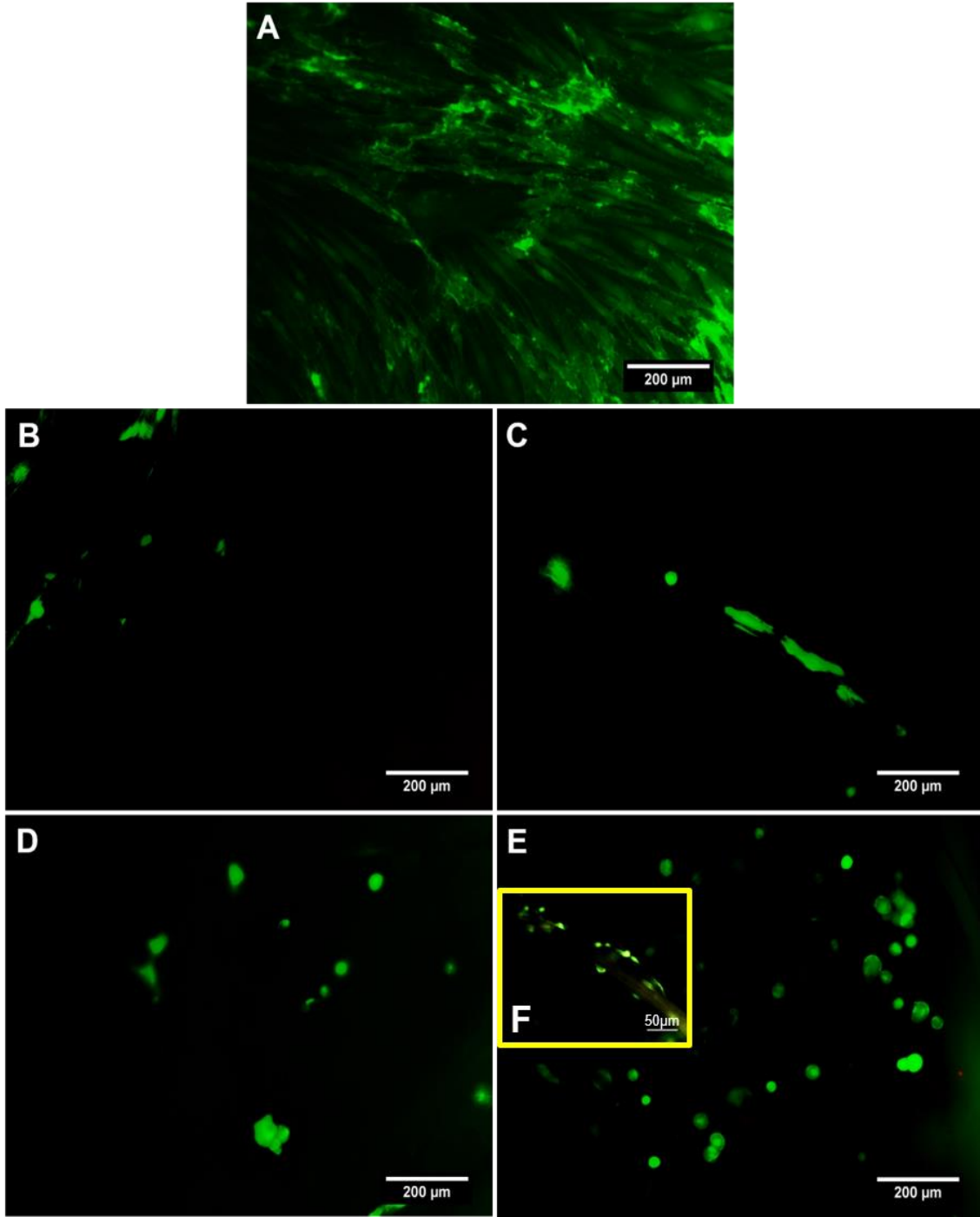




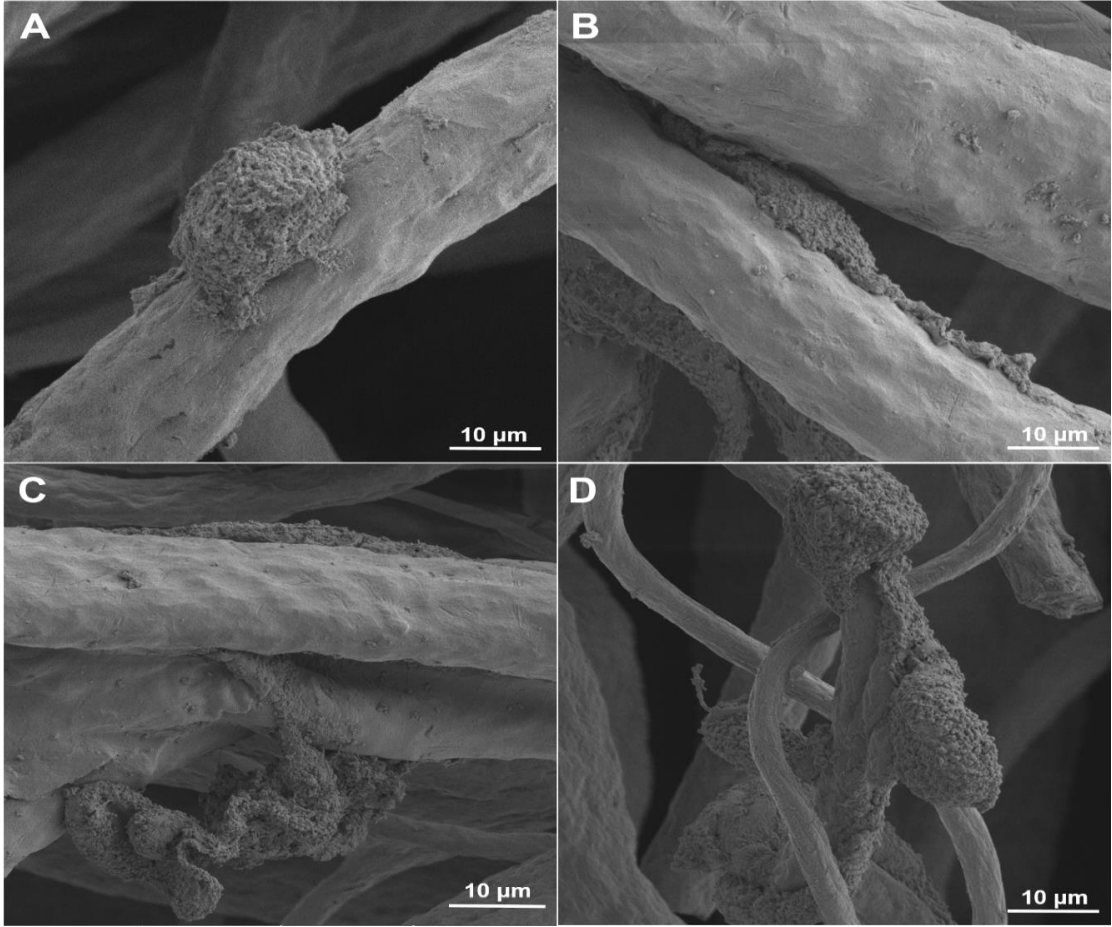
Şekil 4.67. Fibroblast hücrelerin jiro-fiberler ile kültürünün 1. gün canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) TCP, B) PGS, C) PXS, D) PGS-ko-PEG ve E) PXS-ko-PEG.



Şekil 4.68. Fibroblast hücrelerin jiro-fiberler ile kültürünün 4. gün canlı/ölu hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) TCP, B) PGS, C) PXS, D) PGS-ko-PEG ve E) PXS-ko-PEG.



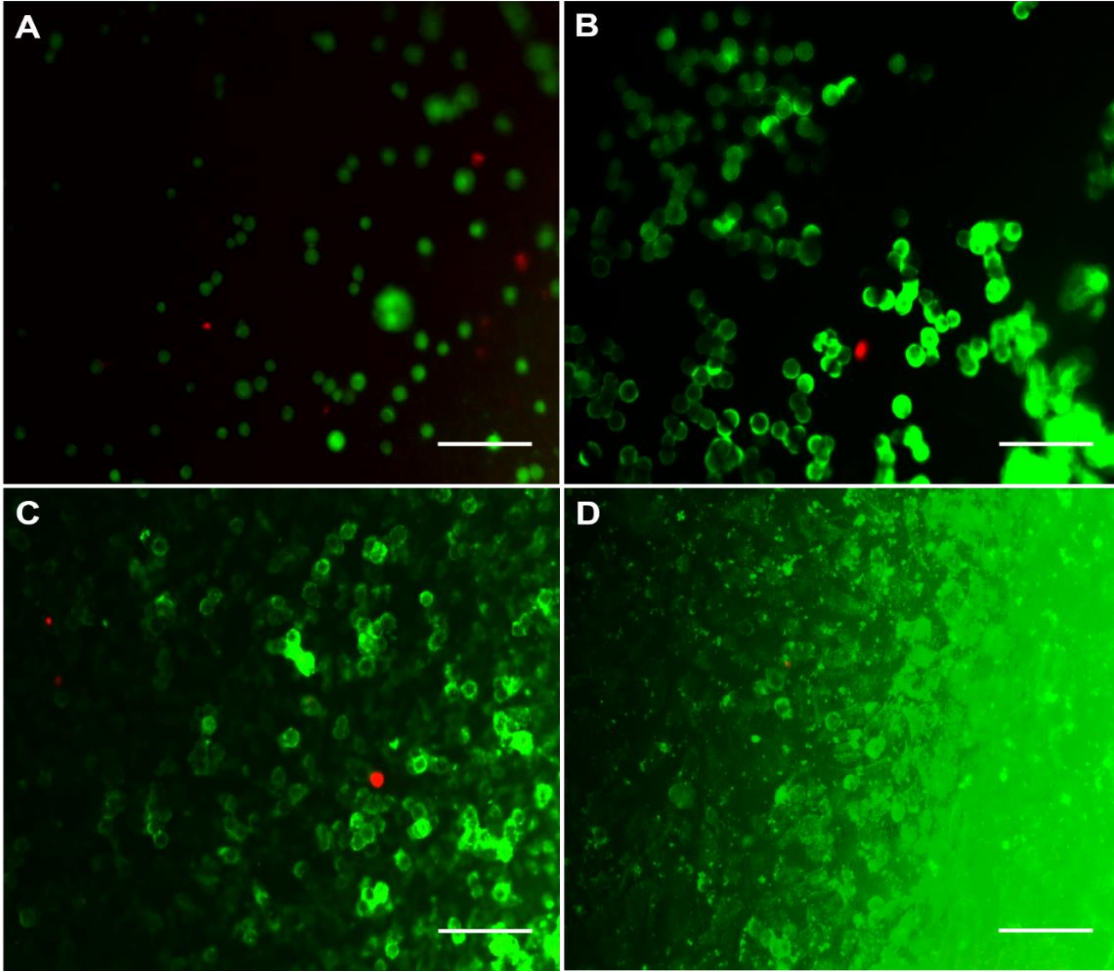
Şekil 4.69. Fibroblast hücrelerin jiro fiberler ile kültürünün 7. gün canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) TCP, B) PGS, C) PXS, D) PGS-ko-PEG ve E) PXS-ko-PEG.



Şekil 4.70. Fibroblast hücrelerin jiro-fiberler ile 7. gün SEM görüntüleri. A) PGS, B) PXS, C) PGS-ko-PEG ve D) PXS-ko-PEG.

#### 4.5. Gel-M Hidrojellerde Hücre Canlılığı

Sentezlenen Gel-M hidrojel yapıların indirekt sitotoksite test sonuçları Şekil 4.48'de verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (%10, 7.5 ve 5 (w/v)) hazırlanan Gel-M hidrojellerin herhangi bir sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. Degradasyon hızı, viskoelastik özellikleri değerlendirildiğinde ileriki çalışmalarda % 7.5'lik (w/v) Gel-M örnek grubu ile devam edilmesine karar verilmiştir. Bu nedenle canlı/ölü hücre testi bu hidrojellerde 1, 4, 7 ve 14 günlerde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.71'de verilmiştir. Gel-M hidrojellerde hücre canlılığının yüksek olduğu ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunun arttığı gözlenmiştir.



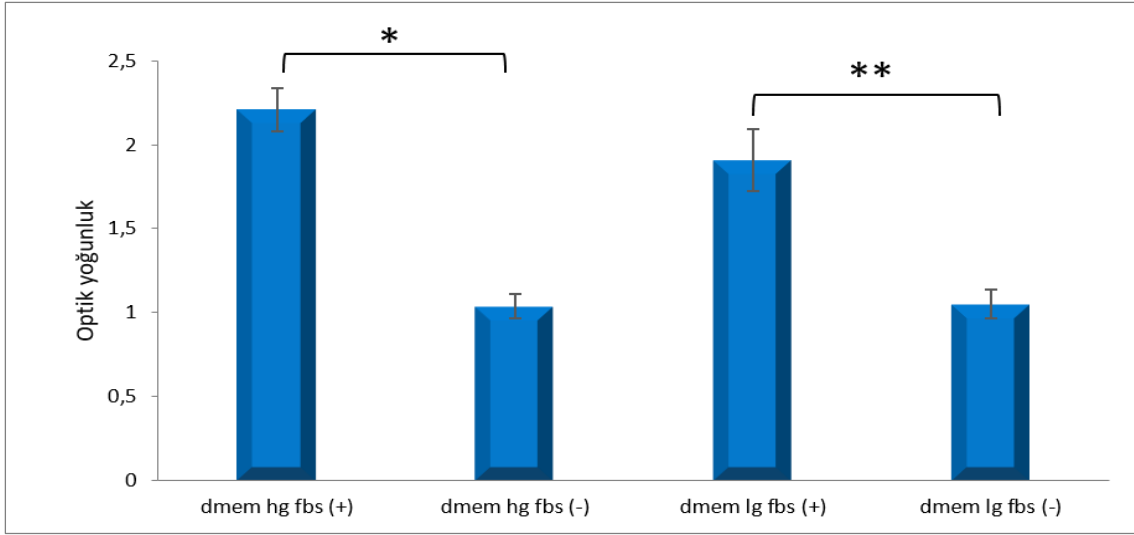
Şekil 4.71. Keratinosit hücrelerin Gel-M hidrojellerde canlı/ölü hücre testi floresan mikroskop görüntüleri. A) 1 gün, B) 4 gün, C) 7 gün, D) 14 gün (ölçek:200  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.6. Jiro Eğrilmiş Fiber Destekli Hibrid Hidrojel Doku İskelelerinde Ko-Kültür Çalışmaları

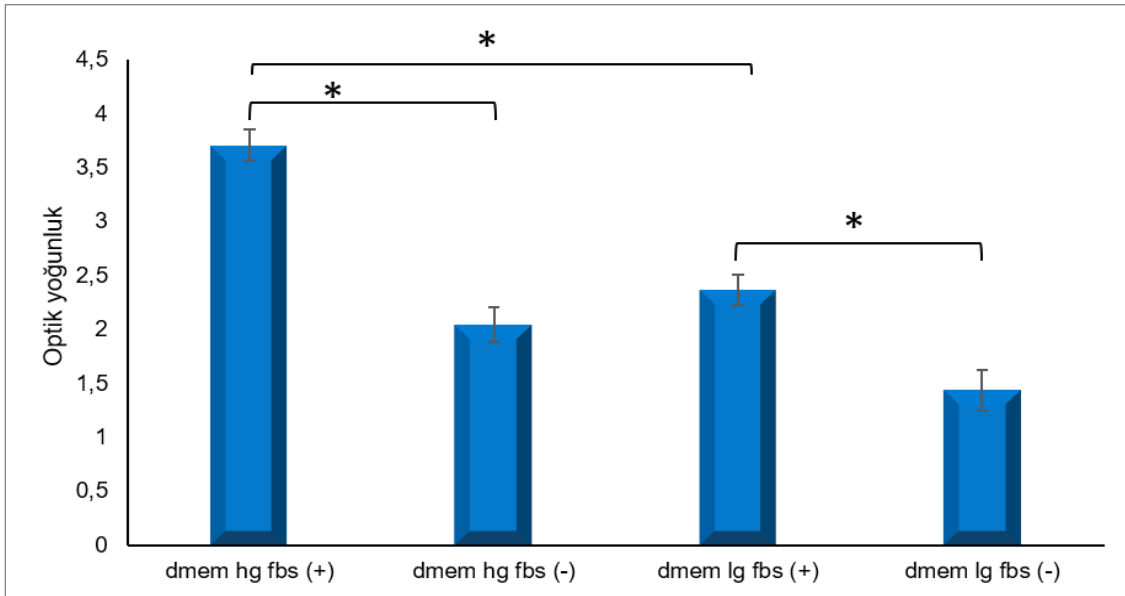
Basınçlı jirasyon tekniği hızlı, kolay üretim koşulları nedeniyle EHD portatif tabanca sistemi ile üretilen fiberlere kıyasla büyük avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle fiber-hidrojel doku iskelesi sisteminde jiro-eğrilmiş fiberlerin kullanılması uygun bulunmuştur.

Jiro-eğrilmiş fiber destekli hidrojel doku iskelelerin ko-kültür çalışmalarında insan kaynaklı deri fibroblast ve keratinosit hücreleri kullanılmıştır. Öncelikle ko-kültür sisteminde kullanılacak olan besi ortamının belirlenmesi ve serumun hücre canlılığına olan etkisi tespit edilmiştir [178]. Bu amaçla düşük veya yüksek

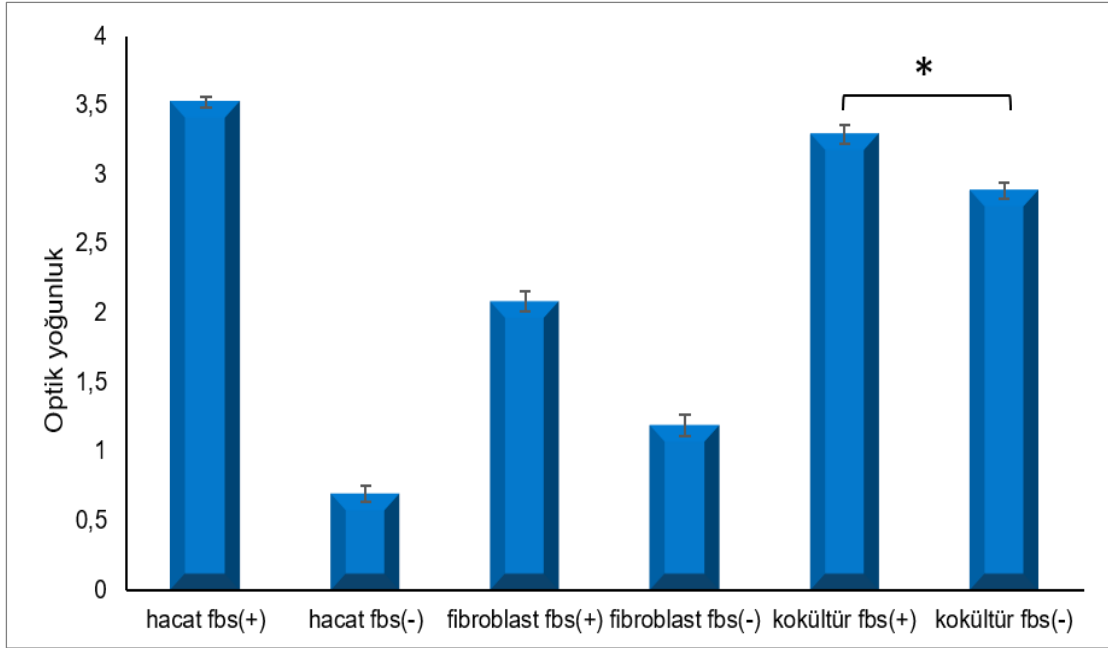
glikoz içerikli besiyeri ve FBS'in ayrı ayrı 2-boyutlu (2B) fibroblast ve keratinosit kültüründe ve bu iki hücrenin beraber kullanıldığı ko-kültür sisteminde hücre canlılığına olan etkisi tespit edilmiştir. Şekil 4.72'de fibroblast hücrelerine düşük ve yüksek glikoz içerikli besiyerinin etkisi FBS varlığında/yokluğunda değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı üzerinde glikoz miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken ( $p>0.05$ ), her iki glikoz miktarında da serumun varlığı hücre canlılığını anlamlı düzeyde artırmıştır ( $p<0.05$ ). Keratinosit hücrelerine glikoz miktarı ve serumun etkisi değerlendirildiğinde ise hücre canlılığı, düşük glikoz seviyesine kıyasla yüksek glikoz seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.73). Serumsuz kültür ortamı fibroblast hücrelerinde olduğu gibi hücre canlılığının anlamlı düzeyde düşmesine neden olmuştur ( $p<0.05$ ). Benzer şekilde literatür verileri incelendiğinde fibroblast ve keratinosit hücrelerinin serum içermeyen kültür ortamında düşük çoğalma hızına sahip oldukları görülmektedir [179]. Bu veriler göz önünde bulundurularak, ortak besiyeri ortamı olarak yüksek glikoz oranı içeren besiyerinin kullanılması uygun bulunmuştur. Belirlenen ortak besiyerinin serumla birlikte etkisi ko-kültürde değerlendirilmiştir (Şekil 4.74). Elde edilen bulgular serumsuz ortamda fibroblast ve keratinosit hücreleri beraber kültür edildiklerinde hücre canlılıkları, ayrı ayrı kültürlerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bununla beraber ko-kültür sisteminde de serumun hücre canlılığına pozitif etki gösterdiği izlenmiş ve bu etki serum kullanılmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Literatür verileri incelendiğinde serumsuz ortamda fibroblast ve keratinosit hücreleri beraber kültüre edildiğinde hücre canlılığının yüksek olduğu görülmektedir [180]. Elde edilen sonuçların literatür verileri ile örtüştüğü tespit edilmiş olup daha yüksek hücre sayısına ulaşarak ko-kültürde in vivo deri yapısına benzer bir yapının oluşturulması amacıyla diğer çalışmalarda serum ve yüksek oranda glikoz içeren besiyeri ortamının kullanılması uygun bulunmuştur.



Şekil 4.72. Fibroblast hücre canlılığına glikoz ve serumun etkisi. \* anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.73. Keratinosit hücre canlılığına glikoz ve serumun etkisi. \* anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.74. Serumun keratinosit, fibroblast hücreleri ve kokültür üzerine etkisi.  
\* anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0.05).

Önceki çalışmalarda PXS-*ko*-PEG polimeri ile üretilen fiberlerin diğer örnek gruplarına oranla daha yüksek oranda hücre tutunması ve proliferasyonu sağlaması nedeniyle *ko*-kültür sisteminde PXS-*ko*-PEG jiro-eğrilmiş fiberlerin kullanılmıştır. *In vivo* deri yapısı incelendiğinde dermis tabakasında epidermise yakın olan kısımda kollajen fiberlerin daha seyrek yerleştiği, alt kısımlara doğru gidildikçe kollajen fiber miktarının arttığı görülmektedir [181]. Dermis tabakasında bulunan bu fibrial yapının taklit edilmesi amacıyla PXS-*ko*-PEG fiberleri kullanılmıştır. Parakrin büyüme faktörü regülasyonunun yanında bazal membranın yeniden oluşması için keratinosit ve fibroblast hücrelerinin etkileşimlerinin oluşması gerekmektedir [182]. Ayrıca keratinosit ve fibroblast hücrelerini beraber kültür edilmesiyle büyüme faktörü, ekstraselüler matris bileşenleri ve direkt hücre-hücre etkileşimi gibi oldukça hayati olan bileşenleri barından bir mikro çevre oluşturularak keratinositlerin büyümesi ve fenotipik özelliklerinin korunmaları sağlanmaktadır [183]. Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada insan keratinosit hücreleri Gel-M üzerine ekilerek kültürün erken dönemlerinde fibroblast hücreleri ile salgıladıkları parakrin faktörler aracılığı ile in-direkt olarak, kültürün geç dönemlerinde ise Gel-M hidrojelini bozunması ile keratinosit-fibroblast etkileşimlerinin direk olarak sağlanması ve böylece *in vivo* deri yapısının başarılı bir şekilde oluşturulması için uygun mikroçevrenin



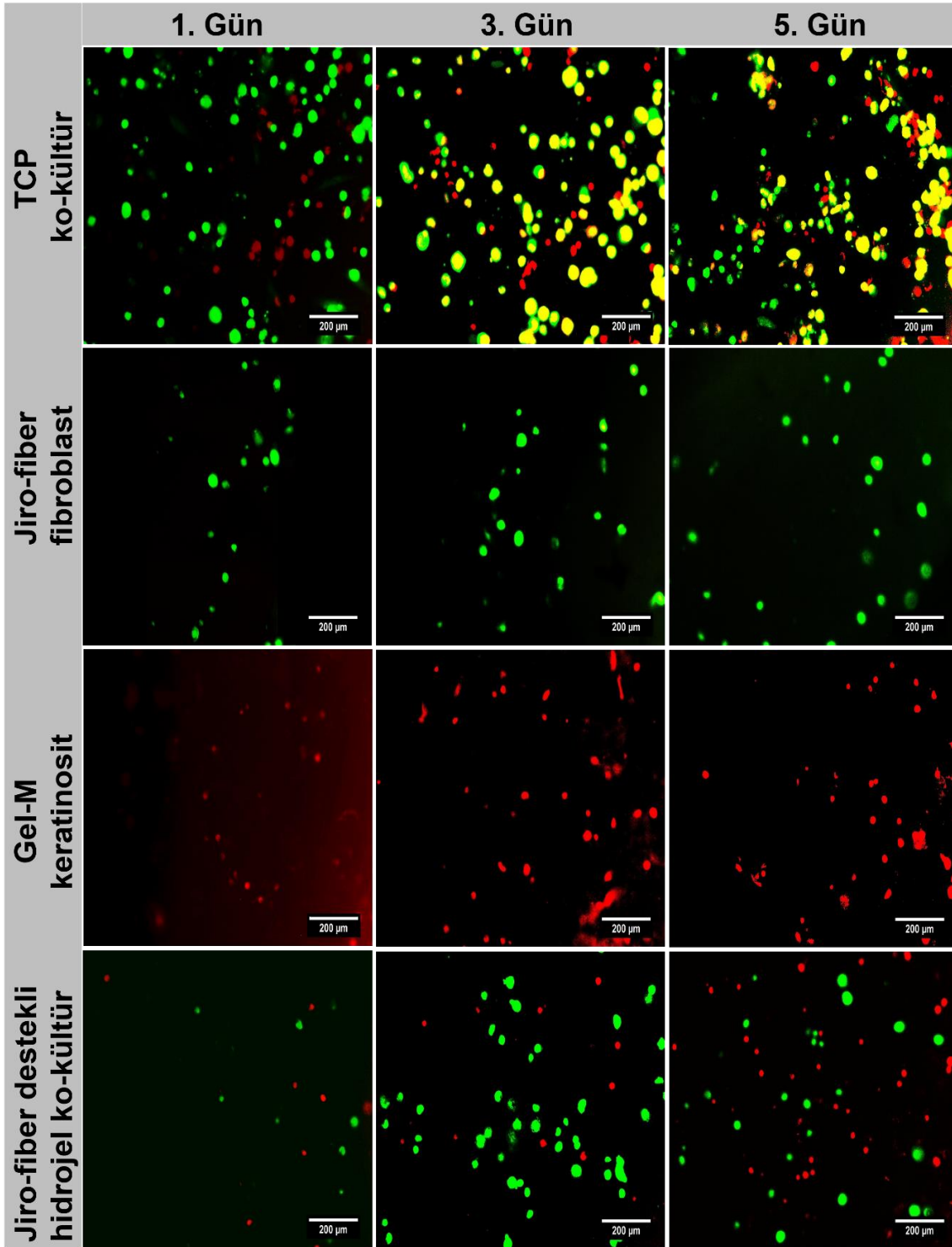
oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla fibroblast hücreleri önce PXS-ko-PEG jiro fiberler üzerine ekilerek, 1 gün boyunca kültürleri sağlanmış, daha sonra Gel-M hidrojelleri fibroblast ekili fiberler üzerine uygulanarak, UV altında kürlenmiştir. Daha sonra keratinosit hücreler hibrid hidrojellerin yüzeyine ekilerek 5 gün boyunca kültür edilmiştir.

Ko-kültür sistemindeki fibroblast ve keratinosit hücrelerinin canlılığı ve etkileşimi hücrelerin farklı dalga boyunda ışıma yapan floresan boyalarla işaretilenerek zamana bağlı olarak görüntülenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Canlı fibroblast hücreleri yeşil renkte görüntülenirken, keratinosit hücreleri kırmızı renkte görüntülenmiştir. Bir, 3 ve 5 gün zaman aralıklarında incelenen ko-kültür sistemine ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.75'de verilmiştir. Aynı zamanda ayrı ayrı jiro-eğrilmiş fiberlerde fibroblast kültürü, hidrojellerde keratinosit kültürü ve 2 boyutlu hücre kültürü de değerlendirilmiştir.

Bütün kültür sistemlerinde (jiro-eğrilmiş fiberlerde fibroblast kültürü, keratinosit yüklü hidrojel kültürü, jiro-eğrilmiş fiber destekli hibrid hidrojel doku iskelelerinde fibroblast-keratinosit ko-kültürü) zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunun arttığı gözlenmiştir. Alınan görüntülerde, 2 boyutlu kültür sisteminde daha fazla hücre görünmekle birlikte bunun nedeni 3 boyutlu sistemlerde (jiro-eğrilmiş fiberler, hidrojel, jiro-eğrilmiş fiber destekli hibrid hidrojel doku iskeleleri) hücre görüntülemede mikroskop kaynaklı problemde kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan eēit sayıda hücre ekimine rağmen keratinosit hücrelerin proliferasyonunun fibroblast hücrelere nazaran daha fazla olduğu izlenmiştir. Bunu sebebi olarak HaCaT hücrelerinin immortalize edilmiş tümorojenik olmayan bir hücre hattı olması [184] ve hücrelerin beraber kültüre edilmesiyle oluşturulan mikroçevrede fibroblast hücreleri tarafından sentezlenen kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri gibi biyokimyasal modülatörlerin keratinosit hücrelerini etkileyerek daha hızlı çoğalmalarını sağladığı düşünülmektedir. Ancak söz konusu modülatörlerin tespit edilerek tanımlanması için daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiği dşnlmekte olup gelecek planları arasında yer almaktadır.

Kim ve ark. tarafından gerçekleştirilen fibroblast keratinosit ko-kültüründe fibroblast hücreleri hidrojel içerisinde kültüre edilirken keratin/kitosan ile üretilen elektro-eğrilmiş fiber katmanına keratinosit ekilerek hücre canlılığı incelenmiştir. Ancak elektro-eğirme yöntemi ile üretilen fiber katmanının düşük gözenekliliğinden dolayı hücreler arası etkileşim sağlanamadığı rapor edilmiştir [185]. Ayrıca Gabbot ve Sun tarafından yapılan çalışmada mikron ölçekte por büyüklüğüne sahip yüzeylerin fibroblast-keratinosit ko-kültür sisteminde ikili hücre boyama (cell tracker) çalışmaları yapılmış olup, por büyüklüğünün hücre proliferasyonu üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir [179].

Sonuç olarak yapılan çalışmalar ko-kültür sisteminde hücrelerin canlılıklarını devam ettirdiği hem epidermis hem de dermisin taklit edildiği tabakalarda hücrelerin zamanla çoğaldıklarını göstermiştir. Bu sonuçlar tez kapsamında üretilen elastomerik PXS-ko-PEG jiro-eğrilmiş fiberlerin elastik karakterleri, biyouyumlu, biyobozunur, yüksek yüzey alanı-hacim oranı ve mikron ölçekte por yapısına sahip olmaları nedeniyle hücre tutunmasını ve hücre canlılığını desteklediğini göstermektedir. Gel-M hidrojel ile birlikte hazırlanan ko-kültür sisteminde elde edilen sonuçlar da bu verileri doğrular niteliktedir. Ko-kültür sisteminde kullanılan hücrelerin farklı boyalar ile boyanarak floresan görüntülerinin alınması ile hücrelerin zamana bağlı olarak canlılıkları ve hibrid doku iskelesi üzerindeki yerleşimlerine ait nasıl yerleştikleri konularında bilgi vermektedir. Ancak bu sistemin *in vivo* benzeri bir deri yapısının oluşmasına etkisini değerlendirmek için uzun kültür süresinde gerek mRNA gerekse de protein düzeyinde spesifik belirteçlerin gösterilmesi gerekmektedir. Bu çalışmalar ileriki dönem için planlanmıştır.



Şekil 4.75. Fibroblast ve keratinosit hücrelerin jiro-eğrilmiş fiber destekli hibrid hidrojel doku iskelelerinde 1, 3 ve 5. gün floresan mikroskop görüntüleri (yeşil: fibroblast, kırmızı: keratinosit).

## 5. YORUM

Poli(poliol)sebakat bazlı, PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG polimerlerinin mikrodalga destekli ön polimerizasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen polimerlerinin kimyasal yapıları FT-IR ve NMR incelemeleri ile doğrulanmıştır. Mikrodalga polimerizasyon tekniği sayesinde ön polimer sentez süresi yaklaşık 4 dk bir sürede gerçekleşerek, uzun sentez aşamasında yaşanan sorun çözülmüş aynı zamanda düşük basınç, yüksek sıcaklıkta gerçekleşen reaksiyon koşulları kolaylaştırılmıştır.

Mikropolimerizasyon tekniği ile sentezlenen PGS, PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG ön polimerlerin ısı çapraz bağlanma işleminden sonra termal kararlılıklarının arttığı izlenmiştir. Polimer sentezinde kullanılan monomer molekül ağırlığı ve esnek zincir yoğunluğu ile orantılı olarak camsı geçiş sıcaklığında düşüş gözlenmiştir.

Monomer mol oranları, PEG molekül ağırlıkları ve çapraz bağlama süreleri optimize edilerek, elastomer yapıda PGS, PXS polimerleri ve PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG ko-polimerleri elde edilmiştir. Elastomerik yapıdaki PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG ko-polimerlerinde, % uzama değerleri sırasıyla %150 ve %160 değerlerinde bulunmuştur. PGS, PXS polimerlerine göre bu artışın yapıdaki PEG zincirlerinden kaynaklandığı sonucuna ulaşılmıştır. PXS-*ko*-PEG polimerlerinin Young's modülüsünün 0.06 MPa değerine düştüğü gözlenmiştir.

Ko-polimerlerde, PEG'in katkısıyla hidrolitik bozunmayı artırdığı, artan çapraz bağ yoğunluğunun ise hidrolitik bozunma hızını azalttığı tespit edilmiştir.

Sentezlenen tüm polimerlerin hücreler üzerine sitotoksik etki göstermediği görülmüştür, bu polimerlerin medikal uygulamalarda ve doku mühendisliği alanında güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

EHD taşınabilir tabanca düzeneği ile PGS ve PXS, PGS-*ko*-PEG ve PXS-*ko*-PEG bazlı polimerlerden düzgün morfolojide ve 1 mikron çapında fiberler

üretimiştir. Polimer çözeltilerinin iletkenlik değerlerdeki artış jet oluşumunda şırınga-jet oluşumu arasındaki mesafenin ksalmasını sağlayarak toplayıcıdaki fiber alanını arttırıcı etki gösterdiği izlenmiştir. EHD taşınabilir tabanca ile üretilen elastomer fiberlerin direkt hücre kültürü testleri sonucunda zamana bağlı olarak hücre tutunması ve canlılığının arttığı, monomer veya çözücü kaynaklı toksisitenin olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar canlı/ölü floresan hücre kültürü testi ve SEM görüntüleri ile elde edilen sonuçlarla da desteklenmiştir.

Basınçlı-jirasyon tekniği ile fiber üretimi için farklı molekül ağırlıklarında PVA kullanılmış ancak düşük molekül ağırlıklı PVA kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, artan konsantrasyon ve viskoziteye bağlı olarak düzgün morfolojide fiberler elde edilmiştir. EHD taşınabilir tabanca tekniği ile karşılaştırıldığında, basınçlı jirasyon tekniği ile 3 boyutlu poröz yığın fiberlerin doku iskelesi olarak kullanıma daha uygun oldukları görülmüştür. Özellikle PXS-ko-PEG polimerleri ile üretilen jiro-eğrilmiş fiber yapıları hücre tutunması ve yayılmasına yüksek oranda imkan sağladığı izlenmiş ve hibrid hidrojellerin hazırlanmasında bu fiberlerin kullanılması kararlaştırılmıştır.

Fiber destekli hibrid hidrojellerin hazırlanmasında ECM'i başarıyla taklit eden Gel-M hidrojelleri kullanılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Gel-M hidrojelleri içinde % 7.5 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanan hidrojelin viskoelastik özellik gösterdiği, şişme kapasitesinin ve hidrolitik bozunma hızının yumuşak doku uygulamaları için uygun olduğu tespit edilmiştir.

Geliştirilen jiro fiber destekli hibrid hidrojel sistemlerin fibroblast-keratinosit kökültürü için uygun doku iskeleleri olduğu yapılan hücre kültürü çalışmaları ile gösterilmiştir. Ancak bu sistemin dermal-epidermal yapıyı taklit etmesi için daha uzun kültür süresine ve detaylı araştırmalara gereksinim duyduğu açıktır. Bu çalışmaların ileriki dönemlerde yapılması planlanmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] J.P. Vacanti, R. Langer, Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation, *The lancet*, 354 **(1999)** S32-S34.
- [2] B. Seal, T. Otero, A. Panitch, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 34 **(2001)** 147-230.
- [3] R. Shi, D. Chen, Q. Liu, Y. Wu, X. Xu, L. Zhang, W. Tian, Recent Advances in Synthetic Bioelastomers, *International Journal of Molecular Sciences*, 10 **(2009)** 4223.
- [4] Q. Chen, S. Liang, G.A. Thouas, Elastomeric biomaterials for tissue engineering, *Progress in polymer science*, 38 **(2013)** 584-671.
- [5] Y. Wang, G.A. Ameer, B.J. Sheppard, R. Langer, A tough biodegradable elastomer, *Nature Biotechnology*, 20 **(2002)** 602.
- [6] A. Gopferich, Mechanisms of polymer degradation and erosion, *Biomaterials*, 17 **(1996)** 103-114.
- [7] R. Langer, N. Peppas, Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review, *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 23 **(1983)** 61-126.
- [8] O. Bayer, Das Di-Isocyanat-Polyadditionsverfahren (Polyurethane), *Angewandte Chemie*, 59 **(1947)** 257-288.
- [9] P. Krol, Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers, *Progress in materials science*, 52 **(2007)** 915-1015.

- [10] R.J. Zdrahala, I.J. Zdrahala, Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future, *Journal of biomaterials applications*, 14 (1999) 67-90.
- [11] R.H. Cardy, Carcinogenicity and chronic toxicity of 2, 4-toluenediamine in F344 rats, *Journal of the National Cancer Institute*, 62 (1979) 1107-1116.
- [12] S. R., Interaction Of Carcinogen N-Methyl-N-Nitrosourethane With Various Rat Tissues And Their Constituents After A Single Carcinogenic Dose Administered Intragastrically Or Intraperitoneally, *Biochemical Journal*, Portland Press 59 Portland Place, London W1n 3aj, England, 1968, Pp. P13-&.
- [13] J.-Y. Zhang, E.J. Beckman, J. Hu, G.-G. Yang, S. Agarwal, J.O. Hollinger, Synthesis, biodegradability, and biocompatibility of lysine diisocyanate–glucose polymers, *Tissue Engineering*, 8 (2002) 771-785.
- [14] R. Yoda, Elastomers for biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9 (1998) 561-626.
- [15] K. Stokes, R. McVenes, J.M. Anderson, Polyurethane elastomer biostability, *Journal of biomaterials applications*, 9 (1995) 321-354.
- [16] T. Freier, Biopolyesters in tissue engineering applications, *Polymers for regenerative medicine*, Springer, 2006, pp. 1-61.
- [17] M. Zinn, B. Witholt, T. Egli, Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Advanced drug delivery reviews*, 53 (2001) 5-21.
- [18] A. Steinbüchel, Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example, *Macromolecular Bioscience*, 1 (2001) 1-24.

- [19] L.L. Madison, G.W. Huisman, Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, *Microbiology and molecular biology reviews*, 63 (1999) 21-53.
- [20] R.N. Reusch, A.W. Sparrow, J. Gardiner, Transport of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in human plasma, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1123 (1992) 33-40.
- [21] R. Rai, I. Roy, Polyhydroxyalkanoates: the emerging new green polymers of choice, *A Handbook of Applied Biopolymer Technology*, 2011, pp. 79-101.
- [22] L.A. Romero, M.M. Mariscalco, J.D. Fortenberry, O.D. Timmons, Effects of serum and endotoxin in experimental lung injury, *Journal of pediatric surgery*, 25 (1990) 846-848; discussion 849.
- [23] P.S. Calvão, J.-M. Chenal, C. Gauthier, N.R. Demarquette, A.M. Dos Santos, J.Y. Cavaille, Influence of the rubbery phase on the crystallinity and thermomechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate)/elastomer blends, *Polymer International*, 59 (2010) 851-858.
- [24] Z. Spitalsky, T. Bleha, Elastic properties of poly(hydroxybutyrate) molecules, *Macromol Biosci*, 4 (2004) 601-609.
- [25] P. Hron, Hydrophilisation of silicone rubber for medical applications, *Polymer International*, 52 (2003) 1531-1539.
- [26] H.J. Brandon, K.L. Jerina, C.J. Wolf, V.L. Young, Biodurability of retrieved silicone gel breast implants, *Plastic and reconstructive surgery*, 111 (2003) 2295-2306.
- [27] C.A. Sundback, J.Y. Shyu, Y. Wang, W.C. Faquin, R.S. Langer, J.P. Vacanti, T.A. Hadlock, Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material, *Biomaterials*, 26 (2005) 5454-5464.



- [28] D. Motlagh, J. Yang, K.Y. Lui, A.R. Webb, G.A. Ameer, Hemocompatibility evaluation of poly(glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering, *Biomaterials*, 27 **(2006)** 4315-4324.
- [29] Q. Chen, G. Thouas, *Biomaterials: a basic introduction*, CRC Press **2014**.
- [30] J.P. Bruggeman, B.-J. de Bruin, C.J. Bettinger, R. Langer, Biodegradable poly (polyol sebacate) polymers, *Biomaterials*, 29 **(2008)** 4726-4735.
- [31] S. Sant, D. Iyer, A.K. Gaharwar, A. Patel, A. Khademhosseini, Effect of biodegradation and de novo matrix synthesis on the mechanical properties of valvular interstitial cell-seeded polyglycerol sebacate–polycaprolactone scaffolds, *Acta biomaterialia*, 9 **(2013)** 5963-5973.
- [32] C.L. Nijst, J.P. Bruggeman, J.M. Karp, L. Ferreira, A. Zumbuehl, C.J. Bettinger, R. Langer, Synthesis and characterization of photocurable elastomers from poly (glycerol-co-sebacate), *Biomacromolecules*, 8 **(2007)** 3067-3073.
- [33] R. Rai, M. Tallawi, A. Grigore, A.R. Boccaccini, Synthesis, properties and biomedical applications of poly (glycerol sebacate)(PGS): a review, *Progress in polymer science*, 37 **(2012)** 1051-1078.
- [34] Y. Wang, Y.M. Kim, R. Langer, In vivo degradation characteristics of poly (glycerol sebacate), *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterial*, 66 **(2003)** 192-197.
- [35] S.L. Liang, W.D. Cook, G.A. Thouas, Q.Z. Chen, The mechanical characteristics and in vitro biocompatibility of poly(glycerol sebacate)-bioglass elastomeric composites, *Biomaterials*, 31 **(2010)** 8516-8529.
- [36] Q. Liu, M. Tian, T. Ding, R. Shi, L. Zhang, Preparation and characterization of a biodegradable polyester elastomer with thermal processing abilities, *Journal of Applied Polymer Science*, 98 **(2005)** 2033-2041.

- [37] Q. Liu, L. Jiang, R. Shi, L. Zhang, Synthesis, preparation, in vitro degradation, and application of novel degradable bioelastomers—A review, *Progress in Polymer Science*, 37 **(2012)** 715-765.
- [38] I.M. El-Sherbiny, M.H. Yacoub, Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges, *Global Cardiology Science and Practice*, **(2013)** 38.
- [39] K. Varaprasad, G.M. Raghavendra, T. Jayaramudu, M.M. Yallapu, R. Sadiku, A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications, *Materials Science and Engineering: C*, 79 **(2017)** 958-971.
- [40] D. Pasqui, M. De Cagna, R. Barbucci, Polysaccharide-Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties, *Polymers*, 4 **(2012)** 1517.
- [41] S.R. Shin, H. Bae, J.M. Cha, J.Y. Mun, Y.-C. Chen, H. Tekin, H. Shin, S. Farshchi, M.R. Dokmeci, S. Tang, A. Khademhosseini, Carbon Nanotube Reinforced Hybrid Microgels as Scaffold Materials for Cell Encapsulation, *ACS Nano*, 6 **(2012)** 362-372.
- [42] G.M. Raghavendra, T. Jayaramudu, K. Varaprasad, G.S. Mohan Reddy, K.M. Raju, Antibacterial nanocomposite hydrogels for superior biomedical applications: a Facile eco-friendly approach, *RSC Advances*, 5 **(2015)** 14351-14358.
- [43] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M.M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, A. Khademhosseini, Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels, *Biomaterials*, 73 **(2015)** 254-271.
- [44] P.E. Van den Steen, B. Dubois, I. Nelissen, P.M. Rudd, R.A. Dwek, G. Opdenakker, Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37 **(2002)** 375-536.

- [45] P. Dubruel, R. Unger, S. Van Vlierberghe, V. Cnudde, P.J.S. Jacobs, E. Schacht, C.J. Kirkpatrick, Porous Gelatin Hydrogels: 2. In Vitro Cell Interaction Study, *Biomacromolecules*, 8 **(2007)** 338-344.
- [46] A.I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E.H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels, *Biomacromolecules*, 1 **(2000)** 31-38.
- [47] S.L. Thibeault, S.A. Klemuk, X. Chen, B.H.Q. Johnson, In vivo engineering of the vocal fold ECM with injectable HA hydrogels—late effects on tissue repair and biomechanics in a rabbit model, *Journal of Voice*, 25 **(2011)** 249-253.
- [48] J.A. Burdick, M.N. Mason, A.D. Hinman, K. Thorne, K.S. Anseth, Delivery of osteoinductive growth factors from degradable PEG hydrogels influences osteoblast differentiation and mineralization, *Journal of Controlled Release*, 83 **(2002)** 53-63.
- [49] M. Lind, A. Larsen, C. Clausen, K. Osther, H. Everland, Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 16 **(2008)** 690-698.
- [50] S. Huang, X. Fu, Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration, *Journal of Controlled Release*, 142 **(2010)** 149-159.
- [51] G. Gao, T. Yonezawa, K. Hubbell, G. Dai, X. Cui, Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging, *Biotechnology journal*, 10 **(2015)** 1568-1577.
- [52] C.S. Lee, J.P. Gleghorn, N.W. Choi, M. Cabodi, A.D. Stroock, L.J. Bonassar, Integration of layered chondrocyte-seeded alginate hydrogel scaffolds, *Biomaterials*, 28 **(2007)** 2987-2993.

- [53] K. Murakami, H. Aoki, S. Nakamura, S.-i. Nakamura, M. Takikawa, M. Hanzawa, S. Kishimoto, H. Hattori, Y. Tanaka, T. Kiyosawa, Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings, *Biomaterials*, 31 **(2010)** 83-90.
- [54] J.S. Miller, K.R. Stevens, M.T. Yang, B.M. Baker, D.-H.T. Nguyen, D.M. Cohen, E. Toro, A.A. Chen, P.A. Galie, X. Yu, Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues, *Nature materials*, 11 **(2012)** 768.
- [55] W. Lee, J.C. Debasitis, V.K. Lee, J.-H. Lee, K. Fischer, K. Edminster, J.-K. Park, S.-S. Yoo, Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication, *Biomaterials*, 30 **(2009)** 1587-1595.
- [56] S.J. Bryant, R.J. Bender, K.L. Durand, K.S. Anseth, Encapsulating chondrocytes in degrading PEG hydrogels with high modulus: engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production, *Biotechnology and bioengineering*, 86 **(2004)** 747-755.
- [57] H. Hosseinkhani, M. Hosseinkhani, F. Tian, H. Kobayashi, Y. Tabata, Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide–amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor, *Biomaterials*, 27 **(2006)** 5089-5098.
- [58] D.-A. Wang, S. Varghese, B. Sharma, I. Strehin, S. Fermanian, J. Gorham, D.H. Fairbrother, B. Cascio, J.H. Elisseeff, Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue–biomaterial integration, *Nature materials*, 6 **(2007)** 385.
- [59] P.D. Dalton, L. Flynn, M.S. Shoichet, Manufacture of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as nerve guidance channels, *Biomaterials*, 23 **(2002)** 3843-3851.
- [60] L. Luca, A.L. Rougemont, B.H. Walpoth, L. Boure, A. Tami, J.M. Anderson, O. Jordan, R. Gurny, Injectable rhBMP-2-loaded chitosan hydrogel

- composite: Osteoinduction at ectopic site and in segmental long bone defect, *Journal of biomedical materials research Part A*, 96 **(2011)** 66-74.
- [61] Y. Lu, D. Wang, T. Li, X. Zhao, Y. Cao, H. Yang, Y.Y. Duan, Poly (vinyl alcohol)/poly (acrylic acid) hydrogel coatings for improving electrode–neural tissue interface, *Biomaterials*, 30 **(2009)** 4143-4151.
- [62] A. Saarai, T. Sedlacek, V. Kasparkova, T. Kitano, P. Sába, On the characterization of sodium alginate/gelatine-based hydrogels for wound dressing, *Journal of Applied Polymer Science*, 126 **(2012)** E79-E88.
- [63] E. Syková, P. Jendelová, L. Urdžiková, P. Lesný, A. Hejčl, Bone marrow stem cells and polymer hydrogels—two strategies for spinal cord injury repair, *Cellular and molecular neurobiology*, 26 **(2006)** 1111-1127.
- [64] E. Hoch, C. Schuh, T. Hirth, G.E.M. Tovar, K. Borchers, Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23 **(2012)** 2607-2617.
- [65] X. Zhao, Q. Lang, L. Yildirim, Z.Y. Lin, W. Cui, N. Annabi, K.W. Ng, M.R. Dokmeci, A.M. Ghaemmaghami, A. Khademhosseini, Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering, *Advanced Healthcare Materials*, 5 **(2016)** 108-118.
- [66] R.-Z. Lin, Y.-C. Chen, R. Moreno-Luna, A. Khademhosseini, J.M. Melero-Martin, Transdermal regulation of vascular network bioengineering using a photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogel, *Biomaterials*, 34 **(2013)** 6785-6796.
- [67] J.A. Benton, C.A. DeForest, V. Vivekanandan, K.S. Anseth, Photocrosslinking of Gelatin Macromers to Synthesize Porous Hydrogels That Promote Valvular Interstitial Cell Function, *Tissue Engineering Part A*, 15 **(2009)** 3221-3230.

- [68] H. Aubin, J.W. Nichol, C.B. Hutson, H. Bae, A.L. Sieminski, D.M. Cropek, P. Akhyari, A. Khademhosseini, Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels, *Biomaterials*, 31 **(2010)** 6941-6951.
- [69] J. Ramón-Azcón, S. Ahadian, M. Estili, X. Liang, S. Ostrovidov, H. Kaji, H. Shiku, M. Ramalingam, K. Nakajima, Y. Sakka, A. Khademhosseini, T. Matsue, Dielectrophoretically Aligned Carbon Nanotubes to Control Electrical and Mechanical Properties of Hydrogels to Fabricate Contractile Muscle Myofibers, *Advanced Materials*, 25 **(2013)** 4028-4034.
- [70] N. Annabi, Š. Selimović, J.P. Acevedo Cox, J. Ribas, M. Afshar Bakooshli, D. Heintze, A.S. Weiss, D. Cropek, A. Khademhosseini, Hydrogel-coated microfluidic channels for cardiomyocyte culture, *Lab on a Chip*, 13 **(2013)** 3569-3577.
- [71] J. Visser, D. Gawlitta, K.E. Benders, S.M. Toma, B. Pouran, P.R. van Weeren, W.J. Dhert, J. Malda, Endochondral bone formation in gelatin methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles, *Biomaterials*, 37 **(2015)** 174-182.
- [72] G. Tan, L. Zhou, C. Ning, Y. Tan, G. Ni, J. Liao, P. Yu, X. Chen, Biomimetically-mineralized composite coatings on titanium functionalized with gelatin methacrylate hydrogels, *Applied Surface Science*, 279 **(2013)** 293-299.
- [73] Y. Zuo, W. Xiao, X. Chen, Y. Tang, H. Luo, H. Fan, Bottom-up approach to build osteon-like structure by cell-laden photocrosslinkable hydrogel, *Chemical Communications*, 48 **(2012)** 3170-3172.
- [74] A. Tamayol, A.H. Najafabadi, B. Aliakbarian, E. Arab-Tehrany, M. Akbari, N. Annabi, D. Juncker, A. Khademhosseini, Hydrogel Templates for Rapid Manufacturing of Bioactive Fibers and 3D Constructs, *Advanced Healthcare Materials*, 4 **(2015)** 2146-2153.
- [75] L. Klouda, A.G. Mikos, Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 68 **(2008)** 34-45.

- [76] H.G. Schild, Poly (N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, *Progress in polymer science*, 17 (**1992**) 163-249.
- [77] X.-Z. Zhang, Y.-Y. Yang, T.-S. Chung, K.-X. Ma, Preparation and characterization of fast response macroporous poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels, *Langmuir*, 17 (**2001**) 6094-6099.
- [78] H. Feil, Y.H. Bae, J. Feijen, S.W. Kim, Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers, *Macromolecules*, 26 (**1993**) 2496-2500.
- [79] D. Coughlan, F. Quilty, O. Corrigan, Effect of drug physicochemical properties on swelling/deswelling kinetics and pulsatile drug release from thermoresponsive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels, *Journal of Controlled Release*, 98 (**2004**) 97-114.
- [80] K. Na, J.H. Park, S.W. Kim, B.K. Sun, D.G. Woo, H.-M. Chung, K.-H. Park, Delivery of dexamethasone, ascorbate, and growth factor (TGF  $\beta$ -3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes, *Biomaterials*, 27 (**2006**) 5951-5957.
- [81] H. Hatakeyama, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, Bio-functionalized thermoresponsive interfaces facilitating cell adhesion and proliferation, *Biomaterials*, 27 (**2006**) 5069-5078.
- [82] L. He, E.S. Read, S.P. Armes, D.J. Adams, Direct Synthesis of Controlled-Structure Primary Amine-Based Methacrylic Polymers by Living Radical Polymerization, *Macromolecules*, 40 (**2007**) 4429-4438.
- [83] J.A. Killion, L.M. Geever, D.M. Devine, L. Grehan, J.E. Kennedy, C.L. Higginbotham, Modulating the mechanical properties of photopolymerised polyethylene glycol–polypropylene glycol hydrogels for bone regeneration, *Journal of Materials Science*, 47 (**2012**) 6577-6585.
- [84] J.S. Choi, H.S. Yoo, Pluronic/chitosan hydrogels containing epidermal growth factor with wound-adhesive and photo-crosslinkable properties, *Journal of biomedical materials research. Part A*, 95 (**2010**) 564-573.

- [85] S. Ibrahim, C.R. Kothapalli, Q.K. Kang, A. Ramamurthi, Characterization of glycidyl methacrylate - crosslinked hyaluronan hydrogel scaffolds incorporating elastogenic hyaluronan oligomers, *Acta Biomater*, 7 **(2011)** 653-665.
- [86] M.P. Lutolf, G.P. Raeber, A.H. Zisch, N. Tirelli, J.A. Hubbell, Cell-Responsive Synthetic Hydrogels, *Advanced Materials*, 15 **(2003)** 888-892.
- [87] J. Maia, L. Ferreira, R. Carvalho, M.A. Ramos, M.H. Gil, Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels, *Polymer*, 46 **(2005)** 9604-9614.
- [88] M. Shin, H. Yoshimoto, J.P. Vacanti, In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold, *Tissue engineering*, 10 **(2004)** 33-41.
- [89] J. Porter, T. Ruckh, K. Popat, Wiley Interscience Biotechnol, Prog, 25 **(2009)** 1539-1560.
- [90] Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review, *Tissue engineering*, 12 **(2006)** 1197-1211.
- [91] B. Subia, J. Kundu, S. Kundu, Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications, *Tissue engineering*, InTech **2010**.
- [92] Z. Xiang, R. Liao, M.S. Kelly, M. Spector, Collagen–GAG scaffolds grafted onto myocardial infarcts in a rat model: a delivery vehicle for mesenchymal stem cells, *Tissue engineering*, 12 **(2006)** 2467-2478.
- [93] J. Mano, GA Silva, HS Azevedo, PB Malafaya, RA Sousa, SS Silva, LF Boesel, JM Oliveira, TC Santos, AP Marques, NM Neves and RL Reis, *JR Soc, Interface*, 4 **(2007)** 999-1030.
- [94] Y. Nakase, A. Hagiwara, T. Nakamura, S. Kin, S. Nakashima, T. Yoshikawa, K.-I. Fukuda, Y. Kuriu, K. Miyagawa, C. Sakakura, *Tissue*



- engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells, *Tissue engineering*, 12 **(2006)** 403-412.
- [95] S. Zhang, Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly, *Nature biotechnology*, 21 **(2003)** 1171.
- [96] S. Zhang, X. Zhao, L. Spirio, PuraMatrix: self-assembling peptide nanofiber scaffolds, *Scaffolding in Tissue Engineering*. Ma PX, Elisseeff J (eds.), **(2005)** 217-238.
- [97] D. Liang, B.S. Hsiao, B. Chu, Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications, *Advanced drug delivery reviews*, 59 **(2007)** 1392-1412.
- [98] C.S. Kumar, *Tissue, cell and organ engineering*, Wiley-VCH **2006**.
- [99] D.W. Hutmacher, *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*, *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, Elsevier **2000**, pp. 175-189.
- [100] D.W. Hutmacher, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12 **(2001)** 107-124.
- [101] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 17 **(2001)** 63-69.
- [102] D. Mooney, C. Mazzoni, C. Breuer, K. McNamara, D. Hern, J. Vacanti, R. Langer, Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering, *Biomaterials*, 17 **(1996)** 115-124.
- [103] R. Thomson, M. Wake, M. Yaszemski, A. Mikos, Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs, *Biopolymers* li, Springer **1995**, pp. 245-274.
- [104] V. Maquet, R. Jerome, Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation, *Materials Science Forum*, Trans Tech Publ, **1997**, pp. 15-42.

- [105]W. Cui, Y. Zhou, J. Chang, Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery, *Science and Technology of Advanced Materials*, 11 **(2010)** 014108.
- [106]W.K. Lau, P. Sofokleous, R. Day, E. Stride, M. Edirisinghe, A portable device for in situ deposition of bioproducts, *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, 3 **(2014)** 94-105.
- [107]P. Sofokleous, E. Stride, W. Bonfield, M. Edirisinghe, Design, construction and performance of a portable handheld electrohydrodynamic multi-needle spray gun for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C*, 33 **(2013)** 213-223.
- [108]C. Luo, S.D. Stoyanov, E. Stride, E. Pelan, M. Edirisinghe, Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence, *Chemical Society Reviews*, 41 **(2012)** 4708-4735.
- [109]L. Kong, G.R. Ziegler, Fabrication of  $\kappa$ -Carrageenan Fibers by Wet Spinning: Spinning Parameters, *Materials (Basel, Switzerland)*, 4 **(2011)** 1805-1817.
- [110]I.C. Um, C.S. Ki, H. Kweon, K.G. Lee, D.W. Ihm, Y.H. Park, Wet spinning of silk polymer: II. Effect of drawing on the structural characteristics and properties of filament, *International Journal of Biological Macromolecules*, 34 **(2004)** 107-119.
- [111]T. Kamal, I. Ahmad, S.B. Khan, A.M. Asiri, Synthesis and catalytic properties of silver nanoparticles supported on porous cellulose acetate sheets and wet-spun fibers, *Carbohydrate Polymers*, 157 **(2017)** 294-302.
- [112]N. Obregon, V. Agubra, M. Pokhrel, H. Campos, D. Flores, D. De la Garza, Y. Mao, J. Macossay, M. Alcoutlabi, Effect of Polymer Concentration, Rotational Speed, and Solvent Mixture on Fiber Formation Using Forcespinning®, *Fibers*, 4 **(2016)**.

- [113] R.T. Weitz, L. Harnau, S. Rauschenbach, M. Burghard, K. Kern, Polymer nanofibers via nozzle-free centrifugal spinning, *Nano letters*, 8 **(2008)** 1187-1191.
- [114] A.M. Loordhuswamy, V.R. Krishnaswamy, P.S. Korrapati, S. Thinakaran, G.D. Rengaswami, Fabrication of highly aligned fibrous scaffolds for tissue regeneration by centrifugal spinning technology, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 42 **(2014)** 799-807.
- [115] S. Mahalingam, M. Edirisinghe, Forming of polymer nanofibers by a pressurised gyration process, *Macromolecular rapid communications*, 34 **(2013)** 1134-1139.
- [116] Z. Xu, S. Mahalingam, P. Basnett, B. Raimi-Abraham, I. Roy, D. Craig, M. Edirisinghe, Making Nonwoven Fibrous Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Constructs for Antimicrobial and Tissue Engineering Applications by Pressurized Melt Gyration, *Macromolecular Materials and Engineering*, 301 **(2016)** 922-934.
- [117] P.L. Heseltine, J. Ahmed, M. Edirisinghe, Developments in Pressurized Gyration for the Mass Production of Polymeric Fibers, *Macromolecular Materials and Engineering*, 303 **(2018)** 1800218.
- [118] S. Mahalingam, M. Edirisinghe, Forming of polymer nanofibers by a pressurised gyration process, *Macromolecular rapid communications*, 34 **(2013)** 1134-1139.
- [119] S. Mahalingam, M. Meinders, M. Edirisinghe, Formation, stability, and mechanical properties of bovine serum albumin stabilized air bubbles produced using coaxial electrohydrodynamic atomization, *Langmuir*, 30 **(2014)** 6694-6703.
- [120] X. Hong, M. Edirisinghe, S. Mahalingam, Beads, beaded-fibres and fibres: Tailoring the morphology of poly(caprolactone) using pressurised gyration, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 69 **(2016)** 1373-1382.

- [121] G. Eda, S. Shivkumar, Bead-to-fiber transition in electrospun polystyrene, *Journal of Applied Polymer Science*, 106 **(2007)** 475-487.
- [122] S. Mahalingam, B.T. Raimi-Abraham, D.Q.M. Craig, M. Edirisinghe, Solubility–spinnability map and model for the preparation of fibres of polyethylene (terephthalate) using gyration and pressure, *Chemical Engineering Journal*, 280 **(2015)** 344-353.
- [123] B.T. Raimi-Abraham, S. Mahalingam, M. Edirisinghe, D.Q.M. Craig, Generation of poly(N-vinylpyrrolidone) nanofibres using pressurised gyration, *Materials Science and Engineering: C*, 39 **(2014)** 168-176.
- [124] F. Brako, B. Raimi-Abraham, S. Mahalingam, D.Q.M. Craig, M. Edirisinghe, Making nanofibres of mucoadhesive polymer blends for vaginal therapies, *European Polymer Journal*, 70 **(2015)** 186-196.
- [125] S. Mahalingam, B.T. Raimi-Abraham, D.Q.M. Craig, M. Edirisinghe, Formation of Protein and Protein–Gold Nanoparticle Stabilized Microbubbles by Pressurized Gyration, *Langmuir*, 31 **(2015)** 659-666.
- [126] F. Brako, R. Thorogate, S. Mahalingam, B. Raimi-Abraham, D.Q.M. Craig, M. Edirisinghe, Mucoadhesion of Progesterone-Loaded Drug Delivery Nanofiber Constructs, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10 **(2018)** 13381-13389.
- [127] F. Brako, B.T. Raimi-Abraham, S. Mahalingam, D.Q.M. Craig, M. Edirisinghe, The development of progesterone-loaded nanofibers using pressurized gyration: A novel approach to vaginal delivery for the prevention of pre-term birth, *International journal of pharmaceuticals*, 540 **(2018)** 31-39.
- [128] E. Altun, M.O. Aydogdu, F. Koc, M. Crabbe-Mann, F. Brako, R. Kaur-Matharu, G. Ozen, S.E. Kuruca, U. Edirisinghe, O. Gunduz, M. Edirisinghe, Novel Making of Bacterial Cellulose Blended Polymeric Fiber Bandages, *Macromolecular Materials and Engineering*, 303 **(2018)** 1700607.

- [129] T.D. Brown, F. Edin, N. Detta, A.D. Skelton, D.W. Hutmacher, P.D. Dalton, Melt electrospinning of poly(epsilon-caprolactone) scaffolds: phenomenological observations associated with collection and direct writing, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 45 **(2014)** 698-708.
- [130] S. Zhang, B.T. Karaca, S.K. VanOosten, E. Yuca, S. Mahalingam, M. Edirisinghe, C. Tamerler, *Macromol. Rapid Commun.* 14/2015, *Macromolecular rapid communications*, 36 **(2015)** 1301-1301.
- [131] C.K. Sen, G.M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T.K. Hunt, F. Gottrup, G.C. Gurtner, M.T. Longaker, Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy, *Wound repair and regeneration*, 17 **(2009)** 763-771.
- [132] K. Jung, S. Covington, C.K. Sen, M. Januszyk, R.S. Kirsner, G.C. Gurtner, N.H. Shah, Rapid identification of slow healing wounds, *Wound Repair and Regeneration*, 24 **(2016)** 181-188.
- [133] C.G. Decker, Y. Wang, S.J. Paluck, L. Shen, J.A. Loo, A.J. Levine, L.S. Miller, H.D. Maynard, Fibroblast growth factor 2 dimer with superagonist in vitro activity improves granulation tissue formation during wound healing, *Biomaterials*, 81 **(2016)** 157-168.
- [134] D. Tartarini, E. Mele, Stem cells in skin regeneration: biomaterials and computational models, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3 **(2016)**.
- [135] L. Gould, P. Abadir, H. Brem, M. Carter, T. Conner-Kerr, J. Davidson, L. DiPietro, V. Falanga, C. Fife, S. Gardner, E. Grice, J. Harmon, W.R. Hazzard, K.P. High, P. Houghton, N. Jacobson, R.S. Kirsner, E.J. Kovacs, D. Margolis, F. McFarland Horne, M.J. Reed, D.H. Sullivan, S. Thom, M. Tomic-Canic, J. Walston, J.A. Whitney, J. Williams, S. Zieman, K. Schmader, Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research, *Journal of the American Geriatrics Society*, 63 **(2015)** 427-438.

- [136] N. Singh, D.G. Armstrong, B.A. Lipsky, Preventing foot ulcers in patients with diabetes, *Jama*, 293 **(2005)** 217-228.
- [137] I. Yannas, J.F. Burke, Design of an artificial skin. I. Basic design principles, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 14 **(1980)** 65-81.
- [138] J.F. Burke, I.V. Yannas, W.C. Quinby Jr, C.C. Bondoc, W.K. Jung, Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury, *Annals of surgery*, 194 **(1981)** 413.
- [139] I. Yannas, J. Burke, P. Gordon, C. Huang, R. Rubenstein, Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 14 **(1980)** 107-132.
- [140] S. Suzuki, K. Matsuda, N. Isshiki, Y. Tamada, Y. Ikada, Experimental study of a newly developed bilayer artificial skin, *Biomaterials*, 11 **(1990)** 356-360.
- [141] K. Matsuda, S. Suzuki, N. Isshiki, K. Yoshioka, T. Okada, Y. Ikada, Influence of glycosaminoglycans on the collagen sponge component of a bilayer artificial skin, *Biomaterials*, 11 **(1990)** 351-355.
- [142] M. Hermans, R. Hermans, Preliminary report on the use of a new hydrocolloid dressing in the treatment of burns, *Burns*, 11 **(1984)** 125-129.
- [143] J.W. Alexander, L. Wheeler, R. Rooney, J. McDonald, B. MacMillan, Clinical evaluation of Epigard, a new synthetic substitute for homograft and heterograft skin, *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 13 **(1973)** 374-383.
- [144] L. Roberts, W. McManus, K. Shirani, Biobrane and porcine: a comparative study, *Proc. Am. Bum. Assoc*, 17 **(1985)** 84.
- [145] J. Stein, Use of nylon silicone collagen membrane (biobrane) for physiological burn wound coverage, *ISBI Meeting. Melbourne, Australia*, **1986**.

- [146] C. Gokoo, K. Burhop, A comparative study of wound dressings on full-thickness wounds in micropigs, *Advances in Skin & Wound Care*, 6 (1993) 42-55.
- [147] B.S. Atiyeh, S.N. Hayek, S.W. Gunn, New technologies for burn wound closure and healing—review of the literature, *Burns*, 31 (2005) 944-956.
- [148] N. Ojeh, I. Pastar, M. Tomic-Canic, O. Stojadinovic, Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications, *International journal of molecular sciences*, 16 (2015) 25476-25501.
- [149] L.M. Wilkins, S.R. Watson, S.J. Prosky, S.F. Meunier, N.L. Parenteau, Development of a bilayered living skin construct for clinical applications, *Biotechnology and bioengineering*, 43 (1994) 747-756.
- [150] J. Trent, R. Kirsner, Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent, *International journal of clinical practice*, 52 (1998) 408-413.
- [151] W.H. Eaglstein, M. Iriundo, K. Laszlo, A composite skin substitute (Graftskin) for surgical wounds, *Dermatologic Surgery*, 21 (1995) 839-843.
- [152] J.F. Hansbrough, D.W. Mozingo, G.P. Kealey, M. Davis, A. Gidner, G.D. Gentzkow, Clinical trials of a biosynthetic temporary skin replacement, Dermagraft-Transitional Covering, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds, *The Journal of burn care & rehabilitation*, 18 (1997) 43-51.
- [153] G.F. Purdue, J.L. Hunt, J.M. Still Jr, E.J. Law, D.N. Herndon, I.W. Goldfarb, W.R. Schiller, J.F. Hansbrough, W.L. Hickerson, H.N. Himel, A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds, *The Journal of burn care & rehabilitation*, 18 (1997) 52-57.
- [154] A. Klama-Baryła, D. Kitala, W. Łabuś, M. Kraut, J. Glik, M. Nowak, M. Kawecki, Autologous and Allogeneic Skin Cell Grafts in the Treatment of

Severely Burned Patients: Retrospective Clinical Study, Transplantation Proceedings, 50 **(2018)** 2179-2187.

- [155] H. Aydin, K. Salimi, Z. Rzaev, E. Pişkin, Microwave-assisted rapid synthesis of poly (glycerol-sebacate) elastomers, Biomaterials Science, 1 **(2013)** 503-509.
- [156] Á. Conejero-García, H.R. Gimeno, Y.M. Sáez, G. Vilariño-Feltrer, I. Ortuño-Lizarán, A. Vallés-Lluch, Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly (glycerol sebacate), European Polymer Journal, 87 **(2017)** 406-419.
- [157] J.P. Bruggeman, C.J. Bettinger, R. Langer, Biodegradable xylitol-based elastomers: In vivo behavior and biocompatibility, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 95 **(2010)** 92-104.
- [158] A. Patel, A.K. Gaharwar, G. Iviglia, H. Zhang, S. Mukundan, S.M. Mihaila, D. Demarchi, A. Khademhosseini, Highly elastomeric poly (glycerol sebacate)-co-poly (ethylene glycol) amphiphilic block copolymers, Biomaterials, 34 **(2013)** 3970-3983.
- [159] M. Zhang, Y. Wu, X. Zhao, K. Gao, P.X. Ma, B. Guo, Biocompatible degradable injectable hydrogels from methacrylated poly (ethylene glycol)-co-poly (xylitol sebacate) and cyclodextrins for release of hydrophilic and hydrophobic drugs, Rsc Advances, 5 **(2015)** 66965-66974.
- [160] G. Camci-Unal, D. Cuttica, N. Annabi, D. Demarchi, A. Khademhosseini, Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels, Biomacromolecules, 14 **(2013)** 1085-1092.
- [161] E. Hoch, T. Hirth, G.E. Tovar, K. Borchers, Chemical tailoring of gelatin to adjust its chemical and physical properties for functional bioprinting, Journal of Materials Chemistry B, 1 **(2013)** 5675-5685.
- [162] R. Rai, M. Tallawi, N. Barbani, C. Frati, D. Madeddu, S. Cavalli, G. Graiani, F. Quaini, J.A. Roether, D.W. Schubert, Biomimetic poly (glycerol



- sebacate)(PGS) membranes for cardiac patch application, *Materials Science and Engineering: C*, 33 **(2013)** 3677-3687.
- [163] C.J. Bettinger, B. Orrick, A. Misra, R. Langer, J.T. Borenstein, Microfabrication of poly (glycerol–sebacate) for contact guidance applications, *Biomaterials*, 27 **(2006)** 2558-2565.
- [164] Y. Li, G.A. Thouas, Q. Chen, Novel elastomeric fibrous networks produced from poly (xylitol sebacate) 2: 5 by core/shell electrospinning: Fabrication and mechanical properties, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 40 **(2014)** 210-221.
- [165] X.J. Loh, A.A. Karim, C. Owh, Poly (glycerol sebacate) biomaterial: synthesis and biomedical applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 3 **(2015)** 7641-7652.
- [166] P. Ma, T. Li, W. Wu, D. Shi, F. Duan, H. Bai, W. Dong, M. Chen, Novel poly (xylitol sebacate)/hydroxyapatite bio-nanocomposites via one-step synthesis, *Polymer Degradation and Stability*, 110 **(2014)** 50-55.
- [167] Q.-Z. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M.Q. Tran, S.E. Harding, N.N. Ali, A.R. Boccaccini, Characterisation of a soft elastomer poly (glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue, *Biomaterials*, 29 **(2008)** 47-57.
- [168] Y. Li, W. Huang, W.D. Cook, Q. Chen, A comparative study on poly (xylitol sebacate) and poly (glycerol sebacate): mechanical properties, biodegradation and cytocompatibility, *Biomedical Materials*, 8 **(2013)** 035006.
- [169] C.A. Sundback, J.Y. Shyu, Y. Wang, W.C. Faquin, R.S. Langer, J.P. Vacanti, T.A. Hadlock, Biocompatibility analysis of poly (glycerol sebacate) as a nerve guide material, *Biomaterials*, 26 **(2005)** 5454-5464.
- [170] B.J. Klotz, D. Gawlitta, A.J. Rosenberg, J. Malda, F.P. Melchels, Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair, *Trends in biotechnology*, 34 **(2016)** 394-407.

- [171]W. Zhu, B.T. Harris, L.G. Zhang, Gelatin methacrylamide hydrogel with graphene nanoplatelets for neural cell-laden 3D bioprinting, Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), **2016** IEEE 38th Annual International Conference of the, IEEE, 2016, pp. 4185-4188.
- [172]G. Gao, A.F. Schilling, K. Hubbell, T. Yonezawa, D. Truong, Y. Hong, G. Dai, X. Cui, Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet-bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA, Biotechnology letters, 37 **(2015)** 2349-2355.
- [173]J.S. Choi, S.W. Lee, L. Jeong, S.-H. Bae, B.C. Min, J.H. Youk, W.H. Park, Effect of organosoluble salts on the nanofibrous structure of electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), International Journal of Biological Macromolecules, 34 **(2004)** 249-256.
- [174]R. Ravichandran, J.R. Venugopal, S. Sundarrajan, S. Mukherjee, R. Sridhar, S. Ramakrishna, Expression of cardiac proteins in neonatal cardiomyocytes on PGS/fibrinogen core/shell substrate for Cardiac tissue engineering, International journal of cardiology, 167 **(2013)** 1461-1468.
- [175]F. Yi, D.A. LaVan, Poly (glycerol sebacate) nanofiber scaffolds by core/shell electrospinning, Macromolecular bioscience, 8 **(2008)** 803-806.
- [176]Y. Yan, V. Sencadas, T. Jin, X. Huang, J. Chen, D. Wei, Z. Jiang, Tailoring the wettability and mechanical properties of electrospun poly (L-lactic acid)-poly (glycerol sebacate) core-shell membranes for biomedical applications, Journal of colloid and interface science, 508 **(2017)** 87-94.
- [177]P. Basnett, S. Mahalingam, B. Lukasiewicz, S. Harding, M. Edirisinghe, I. Roy, Evaluation of porous polyhydroxyalkanoate (PHA) fibres as tissue engineering scaffold. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress. doi: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.00242, **2016**.
- [178]J. Van der Valk, D. Mellor, R. Brands, R. Fischer, F. Gruber, G. Gstraunthaler, L. Hellebrekers, J. Hyllner, F. Jonker, P. Prieto, The

humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture, *Toxicology in vitro*, 18 **(2004)** 1-12.

- [179] C.M. Gabbott, T. Sun, Comparison of human dermal fibroblasts and HaCat cells cultured in medium with or without serum via a generic tissue engineering research platform, *International journal of molecular sciences*, 19 **(2018)** 388.
- [180] T. Sun, M. Higham, C. Layton, J. Haycock, R. Short, S. MacNeil, Developments in xenobiotic-free culture of human keratinocytes for clinical use, *Wound repair and regeneration*, 12 **(2004)** 626-634.
- [181] W.-C. Yan, P. Davoodi, S. Vijayavenkataraman, Y. Tian, W.C. Ng, J.Y. Fuh, K.S. Robinson, C.-H. Wang, 3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation, *Advanced drug delivery reviews*, **(2018)**.
- [182] A. El Ghalbzouri, P. Hensbergen, S. Gibbs, J. Kempenaar, R. van der Schors, M. Ponc, Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents, *Laboratory investigation*, 84 **(2004)** 102.
- [183] C.M. Nelson, M.J. Bissell, Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22 **(2006)** 287-309.
- [184] P. Boukamp, R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N.E. Fusenig, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *The Journal of cell biology*, 106 **(1988)** 761-771.
- [185] J.W. Kim, M.J. Kim, C.S. Ki, H.J. Kim, Y.H. Park, Fabrication of bi-layer scaffold of keratin nanofiber and gelatin-methacrylate hydrogel: Implications for skin graft, *International journal of biological macromolecules*, 105 **(2017)** 541-548.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 31/01/2019

Tez Başlığı / Konusu: POLİ(POLIOL)SEBAKAT BAZLI BİYOBOZUNUR ELASTOMERLERİN SENTEZİ VE JİRO EĞRİLMİŞ FİBER DESTEKLİ HİDROJEL DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam ...150..... sayfalık kısmına ilişkin, ...31.../...01.../...2019..... tarihinde ~~şahsen~~/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~deliri~~
- 3- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı: Merve GÜLTEKİNOĞLU  
Öğrenci No: N12247622  
Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK  
Programı: -  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

Tarih ve İmza

31.01.2019

*Dr. Gültekin*

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

*Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM*

Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve GÜLTEKİNOĞLU BAYRAM  
Doğum yeri : Ankara  
Doğum tarihi : 08.01.1986  
Medeni hali : Evli  
Yazışma adresi : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık  
Temel Bilimleri Anabilim Dalı Sıhhiye / Ankara  
Telefon : 0312 305 40 18  
Elektronik posta adresi : merve.g@hacettepe.edu.tr  
Yabancı dili : İngilizce (YÖKDİL 93,75)

### EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü (2004-2009)  
Malta Üniversitesi (2007-2008) (Erasmus)  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyomühendislik Anabilim Dalı (2011-2013)  
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyomühendislik Anabilim Dalı (2013 -2019)  
İş Tecrübesi : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık  
Temel Bilimleri Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi  
2012-...

### Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi:

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2017-14725 kodlu proje ve 29.977,19 TL bütçe ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilen Bildiriler:

1. Merve Gultekinoglu, Kezban Ulubayram. Synthesis and Characterization of Amphiphilic Poly-ol-sebacate Derivatives. 46<sup>th</sup> IUPAC World Polymer Congress (MACRO), 2016, Istanbul, Turkey.



